



⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑨ EP 0 721 458 B 1

⑩ DE 693 28 693 T 2

⑤ Int. Cl. 7:
C 07 H 21/00

C 12 Q 1/68
C 07 K 1/04
G 01 N 33/68
C 08 F 8/30
C 08 J 3/28

DE 693 28 693 T 2

②1	Deutsches Aktenzeichen:	693 28 693.8
②5	PCT-Aktenzeichen:	PCT/US93/09294
②9	Europäisches Aktenzeichen:	93 923 172.6
②7	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 95/09176
②8	PCT-Anmeldetag:	28. 9. 1993
②7	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	6. 4. 1995
②7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	17. 7. 1996
②7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	17. 5. 2000
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	31. 8. 2000

⑦3 Patentinhaber:
Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif., US

⑦4 Vertreter:
G. Koch und Kollegen, 80339 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB

⑦2 Erfinder:
COASSIN, J., Peter, San Juan Capistrano, US;
MATSON, S., Robert, Orange, US; RAMPAL, B.,
Jang, Yorba Linda, US

⑤4 BIOPOLYMERSYNTHESE MITTELS OBERFLÄCHENAKTIVIERTER ORGANISCHER POLYMERE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 693 28 693 T 2

Best Available Copy

93923172.6

EP 0721458

5

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Synthese von Biopolymeren oder Biomonomeren auf, und die Anlagerung vorher synthetisierter
10 Biopolymere auf oberflächenaktivierten, organischen Polymeren.
Die vorliegende Erfindung findet bei der Synthese von Nukleinsäuren, Peptiden, Proteinen, ebenso wie beim Sequenzieren durch Hybridisierung, beim Peptid/Protein-Sequenzieren und bei der diagnostischen Auswertung auf der genetischen Ebene besondere
15 Brauchbarkeit.

Ausgangspunkt der Erfindung

Die in der Offenbarung dieses Patentbeschlusses dargelegten Artikel
20 und Veröffentlichungen werden nur für die darin enthaltenen Information präsentiert; keine dieser Informationen wird als gesetzlicher "Stand der Technik" anerkannt und wir behalten uns das Recht vor, eine frühere Erfinderschaft bezüglich jeder derartigen Information festzustellen.

25

Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid = "DNA") und Ribonukleinsäure (ribonucleic acid = "RNA") sind lange, fadenförmige Makromoleküle, wobei die DNA eine Desoxyribonukleotid-Kette umfaßt, und wobei die RNA eine Ribonukleotid-Kette um-
30 faßt. Ein Nukleotid besteht aus einem Nukleosid und einem oder mehreren Phosphat-Gruppen; ein Nukleosid besteht aus einer Stickstoffbase, die an einen Pentose-Zucker gebunden ist. Typischerweise ist die Phosphatgruppe an die fünfte Kohlenstoff-("C-5")-Hydroxylgruppe ("OH") des Pentose-Zuckers gebunden;
35 sie kann jedoch auch an der Hydroxylgruppe des dritten Kohlenstoffs ("C-3 OH") gebunden sein. Bei einem DNA-Molekül ist der Pentose-Zucker Desoxyribose, wohingegen bei einem RNA-Molekül der Pentose-Zucker Ribose ist. Die Stickstoffbasen in DNA sind

Adenin ("A"), Cytosin ("C"), Guanin ("G") und Thymin ("T"). Diese Basen sind für RNA dieselben, außer daß Uracil ("U") Thymin ersetzt. Demgemäß sind die Haupt-DNA-Nukleoside, gemeinsam als "Desoxynukleoside" bezeichnet, wie folgt:

- 5 Desoxyadenosin ("dA"), Desoxycytidin ("dC"), Desoxyguanosin ("dG") und Thymidin ("T"). Die entsprechenden Ribonukleoside werden als "A"; "C"; "G" und "U" bezeichnet. (Aus Gewohnheit und weil es kein entsprechendes Thymidin-Ribonukleosid gibt, wird Desoxythymidin typischerweise als "T" bezeichnet; aus
10 Gründen der Konsequenz wird Thymidin jedoch in dieser gesamten Offenbarung als "dT" bezeichnet.

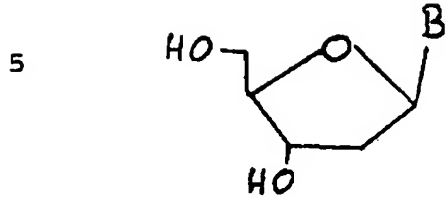
Die Sequenz der Stickstoffbasen des DNA oder RNA-Moleküls kodiert die in dem Molekül enthaltene genetische Information.

- 15 Die Zucker- und Phosphat-Gruppen eines DNA- oder RNA-Moleküls leisten eine strukturelle Rolle, indem sie das Grundgerüst des Moleküls bilden. Speziell ist der Zucker-Anteil jedes Nukleotids an den Zuckeranteil des benachbarten Nukleotids gebunden, so daß das 3'-Hydroxyl des Pentose-Zuckers eines
20 Nukleotids an das 5'-Hydroxyl des Pentose-Zuckers des benachbarten Nukleotids gebunden ist. Die Bindung zwischen den beiden Pentose-Zuckern erfolgt typischerweise über eine Phosphodiester-Bindung. Auf der Grundlage dieser Bindungsvorschrift weist ein Ende ("Terminus") der Nukleotid-Kette einen
25 5'-Terminus (beispielsweise Hydroxyl, Phosphat, Phosphate, etc.) und das andere Ende weist beispielsweise eine 3'-Hydroxyl- oder Phosphat-Gruppe auf. Per Konvention bzw. gewohnheitsmäßig wird die Basensequenz einer Nukleotid-Kette in einer 5'- zu 3'-Richtung geschrieben, d.h. 5'-ATCG-3' oder einfach ATCG.

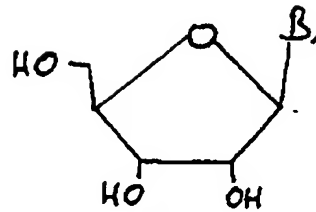
30

- DNA und RNA werden innerlich durch lebende Tiere erzeugt. Jedoch kann DNA und RNA chemisch synthetisiert werden, so daß synthetische Stränge von DNA und RNA schnell und effizient erzeugt werden können. Diese Stränge werden typischerweise als
35 "synthetische Oligonukleotide" oder "Oligonukleotide" bezeichnet. Ein vielverwendetes chemisches Verfahren für die Synthese von Oligonukleotiden wird als "Phosphoramidit-Methodik" bezeichnet. Siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4,415,732,

- McBride, L. und Carthers, M. Tetrahedron Letters, 24:245-248 (1983); und Sinha, N. et al. Nuc. Acids Res. 12:4539-4557 (1984), die alle durch Bezugnahme hierin mit aufgenommen sind. Im Handel erhältliche Oligonukleotid-Synthesegeräte bzw.
- 5 Synthetisierer, die auf der Phosphoramidit-Methodik basieren, schließen beispielsweise das Beckman Instruments OLIGO 1000, die Millipore 8750™ und die ABI 380B™, 392™ und 394™ DNA-Synthesegeräte ein. Ungeachtet der Vorschrift oder des Gerätes, werden synthetische Oligonukleotide am typischsten auf einem
- 10 Trägermaterial "gezüchtet", das typischerweise als "fester Träger" bezeichnet wird. Feste Träger sind vielfältig und gut bekannt; spezielle Angaben hinsichtlich fester Träger werden nachstehend ausführlich dargelegt.
- 15 Die Bedeutung chemisch-synthetisierter Oligonukleotide ist hauptsächlich auf die breite Vielzahl von Anwendungen zurückzuführen, auf die Oligonukleotide gerichtet sein können. Beispielsweise können Oligonukleotide in biologischen Studien verwendet werden, die Gen-Technologie, DNA-Rekombinations-
- 20 Techniken, Antisense-DNA, Nachweis genomischer DNA, Sondieren von DNA und RNA aus verschiedenen Systemen, Nachweis bzw. Feststellung von Protein-DNA-Komplexen, Nachweis einer ortsspezifischen bzw. ortsgerechten Mutagenese, Primer für die DNA und RNA-Synthese, Primer für Amplifikationstechniken,
- 25 wie beispielsweise der Polymerase-Kettenreaktion, Ligase-Kettenreaktion, etc., Matrizen, Linker und molekulare Wechselwirkungs-Studien, einschließen. Die jüngste Aufmerksamkeit im Bereich der Oligonukleotid-Synthese konzentrierte sich auf Verfahren, die im allgemeinen als Sequenzieren durch
- 30 Hybridisierung (Sequencing by Hybridization = SBH) bezeichnet werden, wie sie zuerst von Edwin Southern (siehe Europäische Patentanmeldung Nr. WO 89/10977 "Analyzing Polynucleotide Sequences") offenbart wurde.
- 35 Die sich hauptsächlich wiederholenden Strukturen von DNA- und RNA-Molekülen können als die folgenden Nukleoside veranschaulicht werden:

DNARNA

B = Adenin, Thymin
Guanin, Cytosin



B₁ = Adenin, Uracil
Guanin, Cytosin

Der Hauptschritt in der Nukleinsäure-Synthese ist die spezielle und sequentielle Bildung von Internukleotid-Phosphat-Bindungen zwischen einer 5'-OH-Gruppe eines Nukleotids und einer 3'-OH-Gruppe eines anderen Nukleotids. Demgemäß würde bei der typischen Synthese von Oligonukleotiden die Phosphit-Gruppe eines "ankommenden" Nukleotids mit der 5'-OH-Gruppe eines anderen Nukleotids verbunden (d.h. die 5'-OH-Gruppe ist "phosphoryliert" oder "phosphityliert"). Diese Gruppen müssen in der Lage sein, bei der Synthese der Oligonukleotide aktiv teilzunehmen. Somit werden die 5'-OH-Gruppen modifiziert (typischerweise mit einer Dimethoxytrityl ("DMT")-Gruppe), so daß ein Untersuchender zwei derartige Nukleotide in eine Reaktionskammer einführen kann und die Bedingungen darin so einstellen kann, daß die beiden Nukleotide in geeigneter Weise verbunden werden; durch eine Reihe aufeinanderfolgender derartiger Hinzufügungen kann ein wachsendes Oligonukleotid mit einer definierten Sequenz genau erzeugt werden.

30

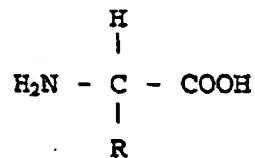
Proteine und Peptide sind notwendige Bestandteile aller lebenden Zellen. Sie sind die Strukturelemente von Zellwänden und Zellmembranen, Enzymen, Immunglobulinen, Antikörpern, Transport-Molekülen und der meisten Hormone. Die Bausteine von Proteinen und Peptiden sind die zwanzig natürlichen Aminosäuren. Jede Aminosäure wird durch die sequentielle bzw. aufeinanderfolgende Gruppierung dreier Nukleotide "kodiert", die als ein "Codon" bezeichnet werden. Weil vier verschiedene Nukleotide existieren

und drei Nukleotide erforderlich sind, um eine Aminosäure zu kodieren, existieren 64 mögliche Codons (4^3). Somit können mehrere Codone dieselbe Aminosäure kodieren; beispielsweise kodieren die Codone GCG, GCA, GCT und GCC alle die Aminosäure 5 Alanin.

Eine Reihe von Aminosäuren, die über Amid-Bindungen korrekt gebunden sind, bilden Protein-Ketten, und die Aminosäure-Sequenz einer derartigen Protein-Kette ("Primärstruktur") bestimmt die 10 sehr komplexen Sekundär- und Tertiär-Strukturen, die für die biologischen Funktionen der Proteine verantwortlich sind.

Jede Aminosäure weist ein Amino- und ein Carboxyl-Ende auf, derartig, daß Proteine und Peptide ein Amino- ("N-") und ein 15 Carboxyl- ("C-") terminales Ende aufweisen. Die allgemeine Formel einer Aminosäure kann wie folgt dargestellt werden:

20



25

wobei R eine von zumindest 20 unterschiedlichen Seitenketten ist (beispielsweise ist die Seitenkette für Alanin eine CH_3 -Gruppe). Die " NH_2 "-Gruppe ist die Amino-Gruppe und die " COOH "-Gruppe ist die Carboxyl-Gruppe.

30

Wie bei Nukleinsäuren können synthetische lineare oder verzweigte Aminosäure-Ketten chemisch synthetisiert werden. Ein besonders gut bekanntes Verfahren zur Synthese von linearen Aminosäure-Ketten, das als "Festphasen-Peptid-Synthese" bezeichnet wird, wurde 1963 durch Merrifield eingeführt. Siehe 35 im allgemeinen Barany, G. und Merrifield, R.B. (1980) in "The Peptides", 2:1-284. Gross, E. und Meienhofer, J., Eds. Academic Press, New York. Automatisierte Peptid-Synthese-Geräte, die

die Festphasen-Peptid-Synthese-Vorschriften anwenden, schließen beispielsweise das ABI 430™ und 431™, das Millipore 9050 Plus PepSynthesizer™ und das Milligen 9500™ und 9600™ ein. Typischerweise ist das C-terminale Ende der ersten Aminosäure an einen festen Träger gebunden, der eine reaktive Gruppe (d.h. die Anbindungsstelle) umfaßt, wohingegen das N-terminale Ende der ersten Aminosäure mit einer labilen Schutzgruppe (d.h. eine Gruppe, die leicht entfernt werden kann) geschützt ist. Die funktionellen Gruppen der Seitenkette auf den Aminosäuren müssen mit den "temporären" Schutzgruppen geschützt werden. Unter geeigneten Bedingungen wird eine in ähnlicher Weise geschützte Aminosäure der unlöslich gemachten ersten Aminosäure zugesetzt, von der die labile Schutzgruppe entfernt wurde. Durch eine Reihe aufeinanderfolgender Zugaben kann eine Aminosäure-Kette synthetisiert werden, wobei der Endschrift typischerweise die Abspaltung der Kette von dem festen Träger und die Entfernung der temporären Schutzgruppen von jeder Aminosäure-Seitenkette ist. Dies führt zu einem biologisch-aktiven Protein oder Peptid.

Oligosaccharide sind die Bausteine für Glykopeptide und Glykolipide; Glykopeptide und Glykolipide können bedeutende Mediatoren biologischer Aktivität sein, indem sie mit Zellmembran-Oberflächen in Wechselbeziehung stehen. Somit können synthetische Oligosaccharide unter anderem verwendet werden, um spezifische Zellmembran-Oberflächen zu treffen, oder die natürliche Bindung von Glykopeptiden und Glykolipiden an eine Zellmembran-Oberfläche zu stören. Synthetische Oligosaccharide haben kürzlich für ihr Vermögen, einen speziellen Arzneistoff auf einem speziellen Gewebe zu treffen, Berühmtheit erlangt. Es wurde von der Festphasen-Synthese von Oligosacchariden berichtet unter Verwendung von Poly-(Ethylenglykol)-Monomethyl-Ether als dem festen Träger. Siehe Douglas, S.P. et al. J. Am. Chem. Soc. 113: 5095-5097 (1991). Siehe weiterhin Rudemacher, T.W. et al. "Glycobiology", Ann. Rev. Biochem. 57: 785-838 (1988).

35

Die festen Träger, die unter anderem für Nukleinsäure-, Protein/Peptid- und Oligosaccharid-Synthese verwendet werden, sind vielfältig. Im Hinblick auf die Nukleinsäure-Synthese, ist ein weit-

hin verwendetes festes Trägermaterial Glas mit spezieller Porengröße (controlled pore glass = CPG). Siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4,458,066. Weitere Materialien schließen Nylon, Polystyrol, beschrieben in WO 91/13098, Polyacrylamid und Zellulose ein. Teflon™-Faserträger wurden als ein Substrat für die Oligonukleotid-Synthese beschrieben. Siehe Lohrmann, R.A. und Ruth, J. (1984) DNA 3:122, PCT-Veröffentlichung WO 85/01051 (veröffentlicht am 14. März 1985) und Molecular Biosystems, Inc. Oxidizable Solid Supports (Kat.Nr. OSS-01 und OSS-02). Im Hinblick auf die Protein/Peptid-Synthese können derartige Materialien beispielsweise vernetztes Polystyrol, Zellulose und Polyamid-Harze einschließen. US-Patent Nr. 4,923,901 beschreibt modifizierte Membranen, an die Oligonukleotide und Peptide gebunden sind. Wie erwähnt wurde Poly-(Ethylenglykol)-Methylmethylether als ein fester Träger für die Oligosaccharid-Synthese verwendet.

Es existiert ein fortwährender Bedarf nach festen Trägern, die bei der Synthese dieser Materialarten brauchbar sind. Dies, weil die bis jetzt verwendeten Materialien mit ihnen verbundene Nachteile aufweisen. Beispielsweise erfordern bestimmte Träger die Verwendung von "Spacer-Armen" oder Linkern, um die Aminosäuren oder Proteine/Peptide tatsächlich an den festen Träger zu binden; wenn derartige Linker verwendet werden, ist es typischerweise oftmals notwendig, Stellen auf der Membran zu blockieren, an denen sich die Linker nicht befinden, in der Bemühung, eine unspezifische Bindung der Biomonomere und Biopolymere an die "Nicht-Linker"-Orte auf dem Träger zu vermindern oder zu verhindern. Siehe beispielsweise Zhung, Y. et al. "Single-base mutation analysis of cancer and genetic diseases using membrane bound modified oligonucleotides", Nuc. Acids Res. 19(14):3927-3933 (1991) (Nylon). Verfahren der Oligonukleotid-Synthese, bei denen ein Linker zwischen dem Träger und der wachsenden Oligonukleotid-Kette verwendet wird, wurden ebenfalls in der EP-A-305 929 und WO 90/15 883 beschrieben.

Weitere Materialien erfordern die Anwendung einer Oberflächen-Modifikation, um auf der Oberfläche des festen Trägers ein

geeignetes Material aufzupfropfen bzw. zu transplantieren, das wiederum die Biomonomere und Biopolymere binden kann. Siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4,923,901 (Polypropylen). Noch weitere Materialien erfordern beispielsweise eine chemische
5 Modifikation des Trägers, um die notwendigen Verbindungen zwischen dem Träger und den Biomonomeren und Biopolymeren zu liefern. Siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4,458,066 (anorganische Polymere). Wie klar ist, liefern diese zusätzlichen Schritte ein Potential für Irrtümer und können sich deswegen
10 negativ auf positive analytische Ergebnisse auswirken, ebenso wie sie die Kosten des Trägers signifikant erhöhen können.

Was gebraucht wird und was deshalb zum Stand der Technik beisteuern würde, sind Materialien, die für die Synthese von Oligo-
15 nukleotiden und Proteinen/Peptiden verwendet werden können, die nicht derartige zusätzliche Vorschriften erfordern, derartig, daß das Material dazu in der Lage ist, schnell, effizient und ökonomisch hergestellt zu werden. Mit einem geeigneten festen Träger-Verfahren könnten Oligonukleotide darauf synthetisiert
20 werden und das sich ergebende Erzeugnis für die Analyse von Patientenproben-DNA zur Bestimmung des Vorhandenseins oder des Fehlens spezieller genetischer Mutationen verwendet werden.

25

Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung, wie in den Ansprüchen definiert, genügt diesem Bedarf indem Träger-Materialien bereitgestellt werden, die bei der Synthese von Biopolymeren brauchbar sind,
30 wobei der Träger Polypropylen ist, das mit einer externen chemischen Spezies modifiziert ist, wobei die Modifikation mittels der Anwendung von Energie in den Mikrowellen- oder Radiofrequenz-Banden auf das organische Polymer in der Gegenwart der externen chemischen Spezies erreicht wird. Bei be-
35 sonders bevorzugten Ausführungsformen werden zu Bereichen interessierender Gene komplementäre Oligonukleotide auf den Polymeren synthetisiert und diese werden wiederum für die

Analyse von Patientenproben auf das Vorhandensein oder Fehlen spezieller genetischer Mutation(en) angewendet..

Vorzugsweise schließen Biopolymere ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Nukleinsäuren, Proteine, Peptide, Hormone, Oligosaccharide, Lipide oder deren synthetische Analoge bzw. Entsprechungen, wie beispielsweise invertierte Nukleotide (Ortigão, J. et al. Antisense Res. Dev. 2:129 (1992)), Peptid-Nukleinsäuren (Egholm M. et al. J. Am. Chem. Soc. 114:1895 (1992)) und Meta-DNA (Hashimoto, H. & Switzer, C. J. Am. Chem. Soc. 114:6255 (1992)), und Kombinationen des vorstehenden. Die Biopolymer-Synthese wird vorzugsweise durch organische, anorganische oder biochemische Mittel und deren Kombinationen erreicht. Am meisten bevorzugt werden Oligonukleotide auf den Polymeren synthetisiert und, wie erwähnt, werden diese zur Analyse bzw. zur Untersuchung von Patientenproben, die DNA umfassen, verwendet.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das organische Polymer Polypropylen, die externe chemische Spezies Stickstoff und Wasserstoff (in der Form von Ammoniakgas), das Nukleophil ist ein Amin und der erhöhte Energie-Zustand wird über Radiofrequenz-Plasma-Entladung erreicht. Somit ist ein besonders bevorzugtes aktiviertes organisches Oberflächen-Polymer ein Polypropylenmaterial, das über Radiofrequenz-Plasma-Entladung animiert wurde. Derartige Materialien werden vorzugsweise für die "am Ort"- oder "in-situ"-Bindung von Nukleotiden und/oder Aminosäuren daran verwendet, ohne den Bedarf nach Spacer-Armen oder Linkern, und sind somit besonders gut für die Synthese von Oligonukleotiden und/oder Peptiden geeignet. Die Amino-Gruppen auf den aktivierten organischen Polymeren sind mit Nukleotiden reaktiv bzw. reaktionsfähig, derartig, daß die Nukleotide und/ oder Aminosäuren, die darin eingeführt werden, kovalent an die Oberfläche des Polymers gebunden werden.

Derartige Oberflächen aktivierte organische Polymere finden insbesondere in den Bereichen von beispielsweise Oligonukleo-

tid-, Peptid-, Oligosaccharid- und Lipid-Synthese Anwendung. Im Hinblick auf beispielsweise Oligonukleotide, die auf derartigen Polymeren synthetisiert werden, finden diese Materialien besondere Brauchbarkeit in den Feldern von beispielsweise Sequenzieren durch Hybridisierung ("SBH") und der genetischen Analyse für Zwecke der medizinischen und diagnostischen Auswertung. Weil Polypropylen "chemisch inert" ist, werden Probleme, die mit einer unspezifischen Bindung verbunden sind, im wesentlichen vermieden, so daß die Nachweisempfindlichkeit signifikant verbessert wird.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 ist das Ergebnis einer Hochdruckflüssigkeits-Chromatographischen Analyse eines abgespaltenen Oligonukleotids mit 17 monomeren Einheiten (mit einer 5'-DMT-Schutzgruppe), die vorher direkt auf aminiertem Polypropylen synthetisiert wurde;

Fig. 2 ist das Ergebnis einer Kapillar-Gel-Elektrophorese-Analyse des Oligonukleotids mit 17 monomeren Einheiten von Fig. 1, wobei die DMT-Gruppe vor der Analyse entfernt wurde;

Fig. 3 ist die Zusammenstellung von Dehybridisierungs-Analysen dreier Oligonukleotid-Sonden von einem definierten Ziel-Oligonukleotid, wobei das Ziel-Oligonukleotid direkt auf aminiertem Polypropylen synthetisiert wurde, wobei jede der Sonden verschiedene Sequenzen aufweist, die zum dem Ziel komplementär oder nicht-komplementär sind;

Fig. 4 ist die Zusammenstellung von Dehybridisierungs-Analysen von Amplicons aus CTFR Exon 10, Normal und CTFR Exon 10, AF508 gegen ein Ziel-Oligonukleotid, das zu CTFR Exon 10, Normal, komplementär ist, wobei das Ziel-Oligonukleotid direkt auf aminierten Polypropylen synthetisiert wurde; und

Fig. 5 ist eine Laser-Drucker-Reproduktion einer Hybridisierung zwischen einer Fluoreszenz-markierten Sonde und einem

Ziel, das direkt auf aminiertem Polypropylen synthetisiert wurde, mit Nachweis der Markierung über eine CCD-Kamera.

5 Ausführliche Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen

Die Festphasen-Synthese von Biopolymeren (beispielsweise Oligonukleotiden, Peptiden, Oligosacchariden, Lipiden, etc.) erfordert, per Definition, ein festes Trägermaterial, von dem das
10 Ausgangs-Startmaterial befestigt wird und von dem die Synthese des Biopolymers gestartet wird. Wie erwähnt wurde, "ist das einzigartige Merkmal der Festphasensynthese der feste Träger selbst, und eine zukünftige Verbesserung der Synthese wird wahrscheinlich vom Finden besserer Träger abhängen." Wallace,
15 R.B. und Itakura, K. "Solid phase synthesis and biological applications of polydeoxyribonucleotides" Kap. 13, Solid Phase Biochemistry Scouten, W.H., Hrsg. John Wiley & Sons (1983). Wie dem Fachmann klar ist, hat sich diese Behauptung als richtig herausgestellt. Weil sich die an der Synthese von Biopolymeren
20 beteiligte Chemie verbessert hat, weil der Bedarf nach derartigen Biopolymeren, insbesondere Oligonukleotiden und Peptiden, zugenommen hat, und weil der Anwendungsbereich derartiger Biopolymere sich erweitert hat, hat der Bedarf nach "besseren Trägern" tatsächlich zugenommen.

25

Im Kern sind die Vorteile, die mit früheren Festen-Träger-Strategien verbunden sind, typischerweise ebenfalls direkt auf die Arten und Anzahlen von Problemen bezogen, die durch deren Anwendung auftraten. Dies, weil zu dem Grad, zu dem derartige
30 Materialien zu chemischen Interaktionen zwischen dem Trägermaterial selbst und dem Biopolymer förderlich sind, die Materialien im selben Grad in einer unspezifischen Art und Weise mit anderen Materialien interagieren können. Beispielsweise finden Filter auf Nylon-Basis weitverbreitete Anwendung im
35 Gebiet der DNA-Analyse, wobei Oligonukleotide direkt mit dem Nylon vernetzt werden. Jedoch ist Nylon mit anderen Materialien sehr reaktiv, derartig, daß typischerweise notwendig, wenn nicht essentiell ist, jede Stelle auf dem Nylon chemisch zu

blockieren, an die der Untersuchende bzw. Forscher nicht wünscht, derartige "unspezifische" Materialien gebunden zu haben. Wie in dem vorstehend erwähnten Zhung-Artikel angemerkt, war es bei einer Bemühung, zu versuchen, die unspezifische
5 Bindung von Proben-DNA an den Ort auf den Nylon-Membranen zu verhindern, an dem Amino-Linker gebundene Oligonukleotid-Sonden sich nicht befanden, notwendig, diese hochreaktiven Stellen zur Vermeidung einer unspezifischen Bindung daran zu blockieren. Diese Vorschrift wurde in einem Bemühen überprüft, ein früheres
10 Verfahren unter Verwendung von Poly-T-Enden als einem Linker zwischen einem festen Träger und Oligonukleotiden zu verbessern. Siehe Saiki, R.K., et al (1989) PNAS USA 86:6230-6234. Es sei erwähnt, daß bei diesen Verfahren die Oligonukleotide als "off-
line"-synthetisiert und anschließend über einen Amino-Linker
15 oder ein Poly-T-Ende an den Träger gebunden beschrieben sind.

Im Fall einer "on-line"-(in-situ)-Synthese, sind die Arten von chemischen Manipulationen, die erforderlich sind, um in Verbindung mit verfügbaren festen Trägern verwendet zu werden,
20 umwerfend. Beispielsweise erzeugt im Fall anorganischer fester Träger, beispielsweise CPG, Quarzglas, Glas, etc. die chemische Struktur dieser Materialien eine "Starrigkeit", von der angenommen wird, daß sie die Biopolymer-Synthese einzwängt. Somit ist es typischerweise insbesondere im Fall von CPG not-
25 wendig, chemische Linker in Verbindung damit zu verwenden. Im Kern sollen diese Linker, ohne Rücksicht auf deren chemische Zusammensetzung oder Länge, einen Grad an "Freiheit" bei der Synthese ergeben, indem sie einen chemisch "biegsamen" Anteil bereitstellen, der an dem Träger am einen Ende befestigt wird,
30 und der dazu in der Lage ist, das wachsende Biopolymer zu binden. Ohne den Linker kann man theoretisch Biopolymere synthetisieren, jedoch werden Gesamterträge, die Schnelligkeit bzw. Geschwindigkeit der Synthese etc. aufs Spiel gesetzt. Als weiteres Beispiel der Synthese von anorganischen Materialien,
35 die Linker verwenden, offenbart die Europäische Patentanmeldung Nr. WO 89/10977 die Verwendung von Glasplatten, die daran gebunden aliphatische Linker zur Verwendung in der in-situ-Synthese von Oligonukleotiden daran aufweisen.

Wie dem Fachmann klar sein wird, sind Linker sehr unberechenbar. Wiederum festgestellt, ist es nicht notwendigerweise klar, welche Art von Linker oder dessen Länge, für irgendein gegebenes Trägermaterial optimal sein wird. Somit ist es typischerweise notwendig, die Bedingungen, Zusammensetzung und Länge irgendeines gegebenen Linkers mit irgendeinem speziellen festen Träger zu optimieren, der einen Linker benötigt.

- 10 Weitere Träger werden tatsächlich nicht als Träger zum Zweck der Biopolymer-Synthese verwendet. Eher werden diese Materialien wegen deren Vermögen verwendet, chemisch mit anderen Materialien zu reagieren, die wiederum einer derartigen Synthese förderlich sind. Beispielsweise beschreiben Khrapko, K.R., et al. "Method for DNA-sequencing by hybridization with oligonucleotid mixture", DNA-Sequence - J. DNA Sequencing and Mapping 1: 375-388 (1991), die Verwendung eines anorganischen Materials (Glas) das ein Polyacrylamid-Gel daran überschichtet aufweist, derartig, daß vorher synthetisierte Oligonukleotide kovalent an die Polyacrylamid-Gel-Schicht gebunden werden können, doch nicht an das anorganische Material. Somit dient das Glas klarerweise hauptsächlich als ein Form-Träger für den tatsächlichen Synthese-Träger. In ähnlicher Weise sind in dem US-Patent Nr. 4,923,901 chemisch inerte Polymere, wie beispielsweise Polypropylen und Polyethylen als zur Nukleinsäure- und Peptid-Synthese brauchbar beschrieben, wenn Polymermonomere mit geeigneten funktionellen Gruppen auf dessen Oberfläche transplantiert werden.
- 30 Im Kern durchläuft der gegenwärtige Stand der Technik die Skala von hochreaktiven Materialien (wie beispielsweise Nylon) bis Materialien, die im Kern als reine Träger für Linker (d.h. Glas-Platten) dienen.
- 35 Hinsichtlich eines Gesamtziels einer Biopolymer-Synthese wurde eine signifikante Menge an Energie und Ressourcen bei der Entwicklung effizienterer Linker oder Mechanismen zur Bindung eines Materials an ein anderes aufgewandt. Siehe beispiels-

weise Maskos, U. & Southern, E.M. "Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesized in situ". Nuc. Acids Res. 20(7): 1079-1684 (1992).

5

Wir haben die Korrektheit von Wallace und Itakura's Konzentration auf "bessere Träger" erkannt, und wir haben einen insgesamt unterschiedlichen Ansatz begonnen und haben unsere Aufmerksamkeit auf das Trägermaterial in toto konzentriert. Indem wir dies tun, erkennen wir, daß ein wahrhaft überlegener fester Träger zur Verwendung bei der Biopolymer- und biochemischen Synthese am bevorzugsten ein Material ist, dem: die chemische strukturelle Starrheit anorganischer Materialien fehlt, so daß Linker verwendet werden können, jedoch nicht erforderlich sind, um in Verbindung mit dem Träger verwendet zu werden; das einer Oberflächen-Aktivierung zugänglich ist, derartig, daß nach Aktivierung die Oberfläche des Trägers dazu in der Lage ist, daran kovalent Biopolymere zu binden und, in Verbindung mit dem ersten Kriterium, der in-situ-Synthese derartiger Biopolymere zugänglich ist; das chemisch inert ist, derartig, daß am Ende der Biopolymer-Synthese Bereiche auf dem Träger, die nicht von den Biopolymeren besetzt sind, einer unspezifischen Bindung nicht zugänglich sind, oder wenn eine derartige unspezifische Bindung auftritt, diese Materialien leicht von der Oberfläche ohne Entfernung des Biopolymers entfernt werden können; und, das einer leichten Handhabung und Manipulation zugänglich ist, derartig, daß das Material in einer Vielzahl unterschiedlicher Zusammenhänge verwendet werden kann.

Wie hierin verwendet, soll der Begriff "Oberflächen aktiviert", wenn er in Verbindung mit Polymer verwendet wird, das Verfahren des Modifizierens eines Polymers bedeuten, derartig, daß externe chemische Spezies auf der Oberfläche des Polymers adsorbiert werden, wodurch die chemische Spezies dazu in der Lage ist, Biopolymere und Biomonomere chemisch an die Oberfläche des Polymers zu binden. Vorzugsweise erfolgt die chemische Bindung über ein Nukleophil und am meisten bevorzugt ist das Nukleophil auf der Oberfläche des modifizierten Polymers.

Wie hierin verwendet, soll der Begriff "Medium", wenn er in Verbindung mit dem Begriff "Polymer" verwendet wird, die physikalische bzw. körperliche Strukturform des Polymers bedeuten; somit kann "Medium" im allgemeinen als Polymer-Filme bzw. -Folien definiert werden (d.h. Polymere, die eine im wesentlichen nicht-poröse Oberfläche aufweisen); Polymer-Membranen (d.h. Polymere, die eine poröse Oberfläche aufweisen); Polymer-Filamente (beispielsweise Netz und Gewebe); Polymer-Perlen, Polymer-Schäume, Polymer-Fritten und Polymer-Fäden. Am meisten bevorzugt ist das Polymer-Medium ein Faden oder eine Membran oder eine Folie.

Wie hierin verwendet soll der Ausdruck "Vorrichtungs-Medium", wenn er in Verbindung mit dem Begriff "Polymer" verwendet wird, irgendeine Vorrichtung bedeuten, an der ein Polymer-Medium befestigt werden kann, wie beispielsweise Mikrotiterplatten, Teströhren, anorganische Blätter, Meßstäbe, etc. Beispielsweise können, wenn das Polymer-Medium ein Polypropylen-Faden ist, ein oder mehrere Polypropylen-Fäden an einer meßstabartigen Kunststoff-Vorrichtung befestigt werden, oder Polypropylen-Membranen können an Glas-Objektträgern befestigt werden. Die spezielle Vorrichtung ist an für sich unwichtig -- alles was notwendig ist, ist, daß das Polymer-Medium daran befestigt werden kann, ohne das funktionelle Verhalten des Polymers oder irgendeines daran adsorbierten Biopolymers zu beeinträchtigen, und daß der Vorrichtungs-Zweck innerhalb jedes Materials, in das die Vorrichtung eingeführt wird (beispielsweise klinische Proben) stabil ist.

30

Wie hierin verwendet, soll der Begriff "adsorbiert" die ihr üblicherweise zugeschriebene Bedeutung in den chemischen und biochemischen Fachgebieten aufweisen. Wiederum festgestellt, wird ein erstes Material, das auf der Oberfläche eines anderen Materials adsorbiert wird, tatsächlich ein Teil des Materials, so daß das erste Material nicht dazu geeignet ist, leicht von der Oberfläche des anderen Materials entfernt zu werden. Beispielsweise umfaßt ein Oberflächen-aktiviertes Polymer

Nukleophile an dessen Oberfläche; unter geeigneten Bedingungen werden Biomonomere, die beispielsweise mit den Nukleophilen reagieren, an die Oberfläche des Biopolymers über derartige Nukleophile kovalent gebunden und deswegen adsorbiert.

5

Wie hierin verwendet soll der Begriff "Oberfläche" eine Tiefe von nicht mehr als ungefähr 5000 Angström (Å), vorzugsweise zwischen ungefähr 10 und ungefähr 1000 Å bedeuten.

- 10 Ein Plasma-Verfahren kann zur Bildung von nukleophilen Spezies verwendet werden, die auf der Oberfläche von Polypropylen adsorbiert werden und derartige nukleophilen Spezies schließen beispielsweise Amin, Hydroxyl, Thiol, Carboxylat und Substituenten ein, die zumindest eines des vorhergehenden umfassen.
- 15 Wenn eine externe chemische Spezies einem Plasma ausgesetzt wird, ergeben sich ionisierte und Radikalformen der externen chemischen Spezies. Wie dem Fachmann klar ist, interagieren derartige ionisierte und Radikalformen unter geeigneten Bedingungen "chemisch" mit dem Polymer, wohingegen die
- 20 nichtionisierte und nicht-radikalisierte Form (Formen) davon keine Neigung dazu haben, chemische Bindungen mit dem Polymer zu bilden.

Wie hierin verwendet soll der Begriff "Biopolymer" sich wieder-

- 25 holende Einheiten biologischer oder chemischer Komponenten bedeuten. Repräsentative Biopolymere schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Nukleinsäuren, Oligonukleotide, Aminosäuren, Proteine, Peptide, Hormone, Oligosaccharide, Lipide, Glykolipide, Lipopolysaccharide, Phospholipide, synthetische
- 30 Analoge bzw. Entsprechungen des vorhergehenden, einschließlic, jedoch nicht beschränkt auf, invertierte Nukleotide, Peptid-Nukleinsäuren, Meta-DNA und Kombinationen des vorstehenden.
- "Biopolymer-Synthese" soll die synthetische Erzeugung, sowohl organisch als auch anorganisch, eines Biopolymers umfassen.
- 35 Einem Biopolymer verwandt ist ein "Biomonomer", das eine einzelne Einheit eines Biopolymers bedeuten soll, oder eine einzelne Einheit, die nicht Teil eines Biopolymers ist. Somit ist beispielsweise ein Nukleotid ein Biomonomer innerhalb eines Oligo-

nukleotid-Biopolymers, und eine Aminosäure ist ein Biomonomer innerhalb eines Protein- oder Peptid-Biopolymers; Avidin, Biotin, Antikörper, Antikörper-Fragmente bzw. Bruchstücke, etc., sind beispielsweise ebenfalls Biomonomere. Zusätzlich soll 5 der Begriff "Start-Biomonomer" und "Starter-Biomonomer" das erste Biomonomer bedeuten, das über reaktive Nukleophile an die Oberfläche des Polymers kovalent gebunden ist, oder das erste Biomonomer, das an einen Linker oder Spacer-Arm zum Polymer gebunden ist, wobei der Linker oder Spacer-Arm über reaktive 10 Nukleophile am Polymer befestigt ist.

Wie hierin verwendet, weist "Analog" bzw. "Entsprechung" oder ein "synthetisches Analog" bzw. "synthetische Entsprechung", wenn in Verbindung mit einem Biomonomer oder einem Biopolymer 15 verwendet, auf natürliche oder nicht-natürliche Varianten des speziellen Biomonomers oder Biopolymers hin. Beispielsweise schließt ein "Antikörper-Analog" chimäre Antikörper, monoklonale Antikörper und Antikörper-Bruchstücke ein; ein "Aminosäure-Analog" schließt Beta-Alanin ein, ein Nukleotid-Analog schließt 20 Inosin und Didesoxynukleotide ein. Das Vorhergehende soll nicht erschöpfend, doch ziemlich repräsentativ sein.

Wie hierin verwendet, bedeutet die Redewendung "Umkehrpunkt-Autoradiogramm" eine Vorschrift, durch die Biopolymere an 25 einen festen Träger gebunden werden, und das Vorhandensein (oder das Fehlen) von Bestandteilen in einem Probenmaterial wird über die Anwendung und nachfolgende Interaktion oder Nicht-Interaktion der Probe an die Biopolymere nachgewiesen. Wie hierin verwendet, soll die Redewendung "Punkt-Autoradio- 30 gramm" eine Vorschrift anzeigen, durch die Bestandteile in oder von einem Probenmaterial an einen festen Träger gebunden werden, und Biopolymer oder Biomonomer-Sonden werden darauf aufgebracht.

35 Wie hierin verwendet sollen die Begriffe "Maske" oder "Maskieren" einen Artikel oder ein Verfahren zur selektiven Blockierung einer biologischen, chemischen oder physikalischen Reaktion von ihrer Entstehung anzeigen. Zur Veranschaulichung

könnte eine Maske einen Screening-Mechanismus einschließen, der oben auf einem organischen Polymer vor Oberflächen-Aktivierung angeordnet wird, derartig, daß diese Regionen bzw. Bereiche des Polymers, die durch den Screening-Mechanismus maskiert oder
5 abgedeckt werden, im wesentlichen nicht Oberflächen-aktiviert sind, nachdem das Polymer Oberflächen-Aktivierungs-Techniken unterworfen wurde, wodurch nur diejenigen Bereiche, die nicht maskiert wurden, im wesentlichen an beispielsweise einer Biopolymer-Synthese teilhaben können. Die Begriffe "Maske" oder
10 "Maskieren" sollen nicht ausschließlich statisch sein, so daß dynamisches Maskieren, d.h. eine Reihe von Maskierungsschritten, zum selektiven Synthetisieren einer Vielzahl unterschiedlicher Biopolymere auf demselben aktivierten organischen Polymer verwendet werden, und sollen ebenfalls in den Umfang dieser
15 Definition fallen.

Wie hierin verwendet, soll die Redewendung "Erkennungs-Domäne" eine Aminosäure-Sequenz anzeigen, die durch einen Rezeptor auf einer Zelloberfläche erkannt wird.

20

Wie hierin verwendet, sollen die Redewendungen "bioreaktives Peptid" ein Peptid anzeigen, das zum Hervorrufen einer Reaktion von einer Zelle in der Lage ist; beispielsweise ist ein Peptid, das eine Erkennungs-Domäne auf der Oberfläche einer Zelle
25 bindet, ein bio-reaktives Peptid.

Wie hierin verwendet, soll der Begriff "Samen" bzw. "Impfgut" eine Zelle anzeigen, die an ein bioreaktives Peptid bindet und an die weitere ähnliche Zellen binden können.

30

Aus Bequemlichkeitsgründen konzentriert sich der Rest der Offenbarung auf die Verwendung des Polymers Polypropylen, die chemische Spezies Ammoniak, Plasma-Vorschriften und die Synthese von Oligonukleotiden und Peptiden. Es sollte klar sein,
35 daß andere Polymere, chemische Spezies, Energie-Aktivierungs-Arten und Biopolymere der hierin offenbarten Erfindung zugänglich sind.

Polypropylen ist chemisch sehr inert und hydrophob; somit kann Polypropylen in sehr korrosiven Umgebungen verwendet werden. Beispielsweise weist Polypropylen gute chemische Beständigkeit gegenüber einer Vielzahl von Mineralsäuren (beispielsweise 5 Salzsäure), organischen Säuren (beispielsweise Ameisensäure, Essigsäure), Basen (beispielsweise Ammoniumhydroxid, Kaliumhydroxid), Salzen (beispielsweise Natriumchlorid), Oxidationsmitteln (beispielsweise Peressigsäure, Jod-Lösungen) und organischen Lösungsmitteln (beispielsweise Aceton, Ethylalkohol, 10 Acetonitril, etc.) auf. Zusätzlich stellt Polypropylen einen Nieder-Fluoreszenz-Hintergrund bzw. -Störpegel bereit. Polypropylen ist gegenüber der Biopolymer-Synthese nicht funktionell; das heißt, an und für sich kann man Oligonukleotide unter Verwendung von Polypropylen als einem Trägermaterial nicht 15 synthetisieren. Somit muß, um Polypropylen für die Synthese von Biopolymeren brauchbar zu machen, dessen Oberfläche über die Einführung von beispielsweise Aminogruppen auf der Oberfläche modifiziert werden. Ein effizientes, schnelles und ökonomisches Verfahren zur Einführung derartiger Aminogruppen auf der 20 Oberfläche eines Polypropylen-Mediums ist die Verwendung einer Plasma-Entladung in einem Ammoniak- oder organischen Amin-enthaltendem Gas.

Ein "Plasma" ist am meisten bevorzugt ein ionisiertes Gas, das 25 eine ausreichende Ionisationsenergie von einem elektromagnetischen Feld erhält. Es zeigt elektromagnetische Kräfte mit langer Reichweite und wird ein Elektrizitäts-Leiter. Plasma besteht aus einer Mischung von Elektronen, Atomen, positiven und negativen Ionen und neutralen freien Radikalen. Die elek- 30 trische Gesamtladung des Plasma ist neutral. Plasma-Energie-Quellen schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Gleichstrom, Wechselstrom, Hochfrequenz, Mikrowellen, Schockwellen und Lasern. Niedertemperatur-Plasma-Behandlungen schließen Hochfrequenz-Plasma-Entladung (radio frequency 35 plasma discharge = RFPD), Mikrowellen-Frequenz-Plasma-Entladung (microwave frequency plasma discharge = MFPD) und Corona-Entladung (corona discharge = CD) ein; derartige Behandlungen beeinflussen typischerweise nur die Oberfläche eines festen

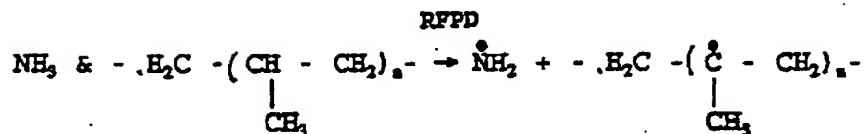
Materials bis zu einer Tiefe von nicht mehr als ungefähr 1000 Å, wobei der Rest des Materials unmodifiziert bleibt.

Oberflächen-Wechselwirkungen mit Plasmas fallen üblicherweise in drei allgemeine Klassen von Reaktions-Möglichkeiten:

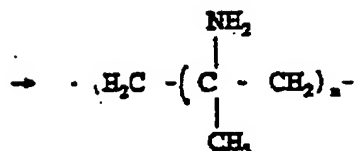
- (1) Chemische Spezies auf der Polymeroberfläche können von der Oberfläche entfernt werden;
- (2) externe chemische Spezies können der Oberfläche des Polymers hinzugefügt werden; oder
- (3) Umlagerung von Bindungen kann innerhalb der Oberfläche des Polymers selbst auftreten. Es ist möglich, daß mehr als eine dieser Reaktionen zur selben Zeit auftreten wird. Die Hauptunterschiede zwischen Plasmaentladung und alternativen Oberflächen-Modifikationen (wie beispielsweise Ionisation oder α - oder β -Bestrahlung), die üblicherweise tief in die Masse des Polymers eindringen, wobei sie dessen Masse-Eigenschaften stark beeinflussen), sind die größere chemische Flexibilität, die hinsichtlich der Wahl von Reaktantengas oder Mischungen zur Erzeugung reaktiver Spezies zur Erzeugung verschiedener Oberflächen-Zustände verwirklicht werden kann, und das Fehlen einer sekundären reaktiven Spezies, die unerwünschte Nebeneffekte verursachen kann.

Polypropylen kann über die Dazu-Einführung von Aminogruppen oberflächen-aktiviert werden, indem RFPD, MFPD oder CD in Ammoniakgas oder andere geeignete Amin-einführenden Dinge verwendet werden, die folgendes einschließen, jedoch nicht beschränkt sind auf aliphatische oder zyklische $C_1 - C_{12}$ Amine, die primär, sekundär oder tertiär sein können. Die Kohlenwasserstoffkette kann geradkettig, verzweigt, gesättigt oder ungesättigt sein, und eine oder mehrere Amino-Gruppen kann an die Kohlenwasserstoffkette gebunden sein. Methylamin, Alkylamin, Ethylendiamin, Diaminocyclohexan sind Beispiele derartiger Amine. Ammoniak wird am meisten bevorzugt.

Bei Vorhandensein eines RFPD, MFPD oder CD ist der wahrscheinlichste Mechanismus für die Anlagerung von Aminogruppen an ein Medium wie folgt:

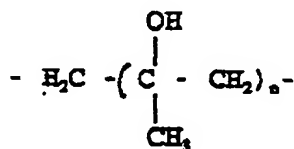


5



Bei Vorhandensein eines Sauerstoffradikals, umfaßt das sich
 10 ergebende oberflächen-aktivierte Polypropylen die folgende
 aktivierte Oberfläche:

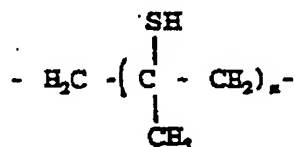
15



20

In der Anwesenheit eines Schwefelradikals umfaßt das sich er-
 gebende oberflächen-aktivierte Polypropylen die folgende akti-
 vierte Oberfläche:

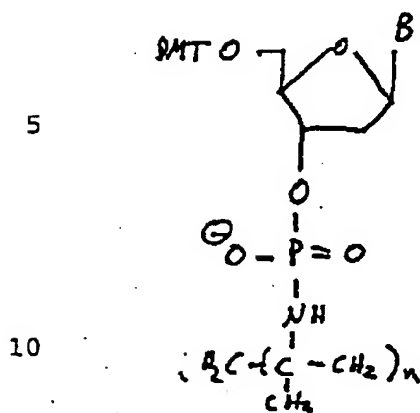
25



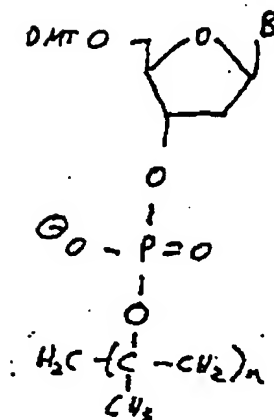
30

Somit kann man beispielsweise unter Verwendung wohlbekannter
 Nukleinsäure-Synthesetechniken die nachfolgenden adsorbierten
 35 Initiations- bzw. Start-Nukleotide erhalten.

PHOSPHORAMIDAT



PHOSPHAT



wobei "A" eine Schutzgruppe ist und wobei "B" eine der vier Basen repräsentiert. Weil ein chemischer Linker nicht erforderlich ist, um das Biomonomer an dem Polymer zu binden, wird das Start-Biomonomer adsorbiert, das heißt wird tatsächlich ein "Teil" des Polymers selbst.

Vorteilhafterweise können MFPD, RFPD und CD effizient gesteuert werden, so daß nur ein Teil des Polymermediums aktiviert zu werden braucht. Indem nur ein Teil der Oberfläche aktiviert wird, bleibt der Rest davon chemisch inert und darin liegt ein Vorteil der vorliegenden Erfindung. Durch Aktivierung nur eines Teils (vorzugsweise) einer Seite der Oberfläche des Polymermediums, werden nur Gegenden bzw. Flächen, die aktiviert sind, der Biopolymer-Synthese zugänglich sein, so daß am Ende beispielsweise einer in-situ-Synthese von Oligonukleotiden, im wesentlichen der gesamte Rest der Oberfläche chemisch inert sein wird. Wenn derartige Oligonukleotide als Sonden für ein genetisches Merkmal verwendet werden, werden somit Probleme, die mit einer unspezifischen Bindung von Nukleinsäure-Makromolekülen an die Oberfläche verbunden sind, vermieden.

Vorzugsweise schließt weniger als ungefähr 50 nMol pro Quadrat-Zentimeter ("nMol/cm²") der Oberfläche des Polymermediums die aktivierte chemische Spezies ein, und bevorzugter zwischen ungefähr 5 bis 15 nMol/cm². Es ist klar, daß diese Werte im Hinblick auf die Höhe-mal-Breite-Fläche der Oberfläche des

Polymermaterials gegeben sind; in einer Situation, in der das Polymermaterial eine poröse Oberfläche umfaßt, finden somit die vorhergehenden Werte keine Anwendung auf die Gesamtoberfläche, die, die Oberflächen-Fläche gegeben, die den Poren zugeschrieben wird, viel größer ist als eine Höhe-mal-Breite-Oberflächen-Fläche. Wechselweise wird bevorzugt, daß weniger als ungefähr 15 %, bevorzugter weniger als ungefähr 10 %, und am meisten bevorzugt weniger als ungefähr 5 % der Oberfläche des Polymermediums die aktivierte chemische Spezies umfassen. Obwohl diese Fläche "klein" oder die Prozentansätze "niedrig" erscheinen mögen, sind dies relative Werte. Man könnte beispielsweise ein Polymermedium verwenden, das beispielsweise eine 100 % aktivierte chemische-Spezies-Oberfläche aufweist. Dies könnte jedoch zu Problemen führen, insofern als die gesamten aktivierten Spezies nicht von einem Start-Biomonomer besetzt werden könnten und somit das Potential für eine unspezifische Bindung zunimmt. Wenn jedoch der Prozentsatz einer Oberflächen-Aktivierung abnimmt, nimmt das Potential zur Sicherstellung, daß jeder aktivierte Anteil der Oberfläche durch ein Start-Biomonomer besetzt wird, beträchtlich zu (insbesondere weil die umgebende Fläche chemisch inert ist).

Plasma-erzeugende Vorrichtungen sind im Handel erhältlich und bei der Erfindung anwendbar. Ein besonders bevorzugter Plasmagenerator ist von Plasma Science, Foster City, CA (Modell-Nr. PS0150E Hochfrequenz) erhältlich. Derartige Vorrichtungen werden bevorzugt, weil die Bedingungen zur Einführung von Gasen, Energie, Zeit der Plasma-Entladung, etc., leicht ausgewählt, variiert, optimiert und gesteuert werden können. Diese Parameter können mit geringem Experimentieren optimiert werden, hauptsächlich, weil der physikalische Zustand des Polymer-Mediums nachteilig beeinflusst wird, wenn beispielsweise die Menge der Energie bzw. Leistung (typischerweise in Watt) zu hoch ist, oder die Zeitlänge der Plasmaentladung zu groß ist -- derartige nachteilige Beeinflussungen werden typischerweise durch die Erzeugung eines "spröden" Polymermediums augenscheinlich. Demgemäß wird dem Fachmann bis zum notwendigen Grad und mit den hierin offenbarten Parametern konsistent, die

Fähigkeit zugetraut, die Bedingungen zur effizienten Oberflächenaktivierung des Polymer-Mediums zu optimieren.

Hinsichtlich der Aminierung von Polypropylen wird es bevorzugt, 5 daß das Gas die folgenden Bestandteile in den folgenden Bereichen umfaßt: Ammoniak (ungefähr 99 bis ungefähr 100 %) und Sauerstoff (ungefähr 0 bis ungefähr 1 %). Die Wattleistung der Stromversorgung ist vorzugsweise zwischen ungefähr 10 und 10 Watt, und am meisten bevorzugt ungefähr 200 Watt. Das Polypropylen und das Gas werden vorzugsweise der Plasma-Entladung für weniger als ungefähr 10 Minuten, bevorzugter ungefähr 1 bis ungefähr 5 Minuten und am meisten bevorzugt ungefähr 2 Minuten unterworfen. Bezüglich der Art der Plasma-Entladung 15 ist es bevorzugt, daß Hochfrequenz-Wellen verwendet werden. Diese sind vorzugsweise innerhalb des Bereichs von ungefähr 1 MHz bis zu ungefähr 20 MHz und am meisten bevorzugt ungefähr 13 MHz. Bezüglich der Mikrowellen-Plasma-Entladung, wird es bevorzugt, daß die Mikrowellen im Bereich von ungefähr 1.000 MHz 20 bis ungefähr 3.000 MHz, und am meisten bevorzugt ungefähr 2.000 MHz sind. Bezüglich einer Corona-Entladung wird es bevorzugt, daß die Behandlungsenergie bzw. der angelegte Strom zwischen ungefähr 10 bis ungefähr 250 Watt, bevorzugter an der Elektrode zwischen ungefähr 10.000 bis 20.000 Volt ist.

25

Das Polymermedium kann gemäß der Erfordernisse des Untersuchenden bzw. des Forschers variiert werden. Es wird bevorzugt, daß das Polymermedium nach der Biopolymer-Synthese einer Sezierung bzw. Aufgliederung zugänglich ist; dieser Vorzug basiert 30 jedoch hauptsächlich auf den beabsichtigten Anwendungen des daraus synthetisierten Biopolymers. Im Bereich beispielsweise einer Nukleinsäure-Analyse auf der genetischen Ebene, betrachten wir es als absolut essentiell, daß die Testvorrichtungen leicht Qualitäts-Kontroll-Verfahren unterworfen werden. Im Wege der 35 Analogie, es ist im Bereich der pharmazeutischen Herstellung relativ einfach, einen Teil (oder Teile) eines umfangreichen Anteils des Arzneimittels abzutrennen, wenn es einmal hergestellt ist: wenn der Teil (Teile) notwendige

Qualitätsgarantie- und Qualitätskontroll-("QA/QC")-Parameter erfüllt, ist dann, aus einem statistischen Blickwinkel, der gesamte Anteil von derselben Qualität; wenn andererseits dieser Anteil (Anteile) die notwendigen QA/QC-Kontrollparameter nicht 5 erfüllt, ist der gesamte Anteil verdächtig. Die Hauptannahme hinter diesem Ansatz ist, daß all die Parameter, die in der Herstellung eines derartigen Anteils involviert sind, dieselben waren, so daß irgendein Proben-Anteil (-Anteile) für den gesamten Anteil repräsentativ sein sollte(n). Wenn der Schau- 10 platz genetischer Analysen expandiert und zunehmende Verwendung findet, werden ähnliche Garantien gefragt und erforderlich sein.

Eingedenk des Vorhergehenden, wird bevorzugt, daß das Polymermedium nach der Biopolymer-Synthese einer Zergliederung zugäng- 15 lich ist.

Ein derartiges Merkmal ermöglicht es, eine Qualitätsgarantie/ Qualitätskontrolle des auf dem Polymermedium synthetisierten Biopolymers durchzuführen. Beispielsweise kann im Fall von Mem- 20 branen ein Abschnitt oder Abschnitte davon, davon abgeschnitten werden, so daß eingehende und stringente analytische Techniken leicht darauf angewendet werden können -- wenn eine derartige Analyse anzeigt, daß beispielsweise eine spezielle Oligonukleotid-Sequenz vorliegt, dann weist, aus einer statistischen Per- 25 spektive, die Gesamtmembran diese Sequenz auf.

Eine Zerschneidung des Polymermediums ermöglicht ebenfalls die Erzeugung multipler Medien, die jeweils das definierte Biopolymer umfassen. Diese können dann zerschnitten werden und 30 ein Stück aus jedem Medium kann an einem einheitlichen Vorrichtungsmedium befestigt werden. Somit kann beispielsweise eine Vielzahl von Meßstäben leicht erzeugt werden, wobei jeder Meßstab mehrere unterschiedliche Polymer-Medien-Abschnitte umfaßt, die spezielle Biopolymere umfassen; somit sind die Bedingungen 35 zur Synthese irgendeines speziellen Biopolymers identisch und ein derartiges Biopolymer ist QA/QC-Vorschriften zugänglich.

Während die Bedürfnisse des Untersuchenden die speziellen, bei der Tauglichkeit einer Zerschneidung involvierten, Parameter bestimmen, bevorzugen wir im Fall von Membranen Polypropylen mit einer Dicke zwischen ungefähr 80 bis ungefähr 100 μm und 5 im Fall von Fäden, Polypropylen mit einem Durchmesser von ungefähr 0,001 Zoll (= 25,4 μm) zu verwenden. Im Fall von Membranen kann eine Zerschneidung leicht mit irgendeiner Abtrennungs-Vorrichtung (beispielsweise Schere) erreicht werden. Im Fall von Fäden wird bevorzugt, daß diese mit einer Vorrichtung 10 zerschnitten werden, die die Enden am Ort des Schnittes "versiegeln" kann, das heißt ein Laser, eine Ultraschall-Vorrichtung oder ein Heißmesser; dieser Vorzug basiert auf einer praktischen Angelegenheit, das heißt, Fäden von gewundenen Fasern sind derartig zusammengesetzt, daß, wenn der Faden ge- 15 schnitten wird, die Fasern dann voneinander getrennt werden. (Die Fasern selbst können natürlich direkt verwendet werden, jedoch werden Fäden bevorzugt, weil sie etwas einfacher handzuhaben sind. Dies ist jedoch wiederum eine Funktion der Wünsche des Untersuchenden.)

20

Die offenbarten Polymere sind besonders gut für die direkte Synthese von beispielsweise Oligonukleotiden und Peptiden darauf geeignet. Vorteilhafterweise sind eine Vielzahl von im Handel erhältlichen Nukleinsäure-Synthesegeräten erhältlich, ein- 25 schließlich des Beckman Instruments OLIGO 1000. Sich auf aminierte Polypropylen-Membranen oder -Fäden konzentrierend, können die Materialien sofort im Anschluß an den Aminierungsprozeß (oder nach Entfernen aus dem Lager) direkt in die Reaktionskammer des Nukleinsäure-Synthesegeräts eingebracht werden; 30 wegen der Vielseitigkeit derartiger Materialien, können sie leicht in den Kammern gehandhabt werden, das heißt im Fall der Membranen lose "gerollt" werden, oder im Fall von Fäden lose eingefügt werden. Vorteilhafterweise kann die Synthese der Oligonukleotide direkt auf dem aminierten Polypropylen 35 vor sich gehen, und infolge der "aktivierten" Natur der Amino-Gruppen werden diese Oligonukleotide direkt an das Polypropylen kovalent gebunden.

Derartige abgeleitete Oligonukleotide sind zur Verwendung in genetischen Screening-Analysen ideal geeignet. Das heißt, durch Verwendung von aminiertem Polypropylen, das Oligonukleotide umfaßt, wobei die Oligonukleotide entweder zu der Wildtyp-
5 oder Mutations-Sequenz eines interessierenden Gens komplementär sind, können vorbereitete Patienten-Proben auf das Vorhandensein oder Fehlen der interessierenden Sequenz ge-screened werden. Es wird bevorzugt, daß die Länge der Oligonukleotide, die zur Verwendung in einer derartigen genetischen Analyse
10 chemisch synthetisiert werden, bis zu ungefähr 250 Basen Länge, vorzugsweise zwischen ungefähr 5 und ungefähr 100 Basen, bevorzugter zwischen 8 und 30 Basen, und am meisten bevorzugt ungefähr 16 Basen ist. Diese Längen müssen als von den Bedingungen abhängig aufgefaßt werden, unter denen die genetische
15 Analyse durchgeführt wird. Beispielsweise ist bei Raumtemperatur (bei welcher Temperatur wir die Analyse durchzuführen bevorzugen) die am meisten bevorzugte Länge 16 Basen; bei niedrigeren Temperaturen, können kürzere (das heißt 8 monomere Einheiten bzw. -mers) verwendet werden.

20

Dem Fachmann wird jederzeit zugetraut, die Methodik zur Herstellung von genomischen Proben aus Patienten zur Analyse zu verstehen. Proben-DNA kann leicht aus beispielsweise klinischen Proben (das heißt Tränen, Samen, Vaginalsekreten, Vollblut,
25 Serum, Plasma, Hautabstriche, etc.) gewonnen und leicht durch eine Vielzahl von Techniken hergestellt werden, die für den Fachmann verfügbar sind. Typischerweise ist es ein Hauptziel dieser Techniken, die Nukleinsäuren bis zu einem ausreichenden Grad zu reinigen, so daß Fremdmaterialien, die ansonsten die
30 eventuelle Amplifikation (beispielsweise durch die Polymerase-Kettenreaktion) der interessierenden Nukleinsäuren stören könnten, entfernt werden. Unter Verwendung von Serum als einem Beispiel, kann die Herstellung der Nukleinsäuren im allgemeinen die folgenden Schritte umfassen: Man inkubiere das Serum für 1
35 Stunde bei 70°C mit Proteinase k (Boehringer Mannheim) bei 2,5 mg/ml in 24 mM MOPS (pH 6,5), 2,5 mM EDTA und 0,5 % SDS. Dem folgen die nachfolgenden Extraktionen: Phenol-Extraktion und Ether-Extraktion. Dem folgt eine Ethanol-Präzipitation. Siehe

beispielsweise A. Larzul et al. J. Heptol. 5:199-204 (1987). Wie erwähnt, sind weitere Vorschriften und Techniken für eine derartige Reinigung leicht erhältlich.

5 Im Anschluß an eine derartige Reinigung ist es (typischerweise) notwendig, die speziellen interessierenden genomischen Bereiche zu amplifizieren. Dies kann leicht erreicht werden, indem Techniken, wie beispielsweise die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) und Primer verwendet werden,
10 die auf den speziell interessierenden Bereich gerichtet sind. Dem Fachmann wird die Fähigkeit zugetraut, die Anwendung derartiger Amplifikations-Techniken auf die genomische Probe, ebenso wie die darin involvierten Parameter (wie beispielsweise Auswahl der Primer, die die Amplifikation eines Gen-Segments
15 oder Bereiches einer Nukleinsäure-Sequenz, die ein Gen umfaßt, im wesentlichen sicherstellt) richtig einzuschätzen und zu verstehen.

Wie es weiterhin vom Fachmann richtig eingeschätzt werden wird,
20 werden Amplifikationen-Techniken, wie beispielsweise PCR, weil die DNA-Probe per Definition zwei komplementäre DNA-Stränge umfaßt, Sätze von komplementären Amplicons erzeugen (ein "Amplicon" ist ein Satz von Strängen des Amplifikations-Produktes, das heißt komplementäre "Amplicons" sind das sich ergebende
25 Produkt einer PCR-Amplifikation). Ein vorgeschlagener Ansatz zur Erhöhung der Probenbindung an Oligonukleotide, die kovalent an aminiertes Polypropylen gebunden sind, ist, einen dieser Sätze aus dem Reaktionsgemisch vor Analyse zu entfernen; dies hat den Effekt einer abnehmenden Konkurrenz zur Hybridisierung
30 der komplementären Amplicons aneinander. Für diesen Ansatz wird nur einer der Amplicon-Sätze einem Screening mit der aminierten Polypropylen-Oligonukleotid-Vorrichtung unterworfen. Ein Ansatz zur Absonderung der Amplicon-Sätze schließt ein Manipulieren der Primer ein. Beispielsweise kann ein Primersatz
35 biotinyliert sein und der andere Satz kann beispielsweise zum Nachweis markiert sein. Somit können die biotinylierten Amplicons nach Amplifikation aus der Probe unter Verwendung beispielsweise von Avidin-beschichteten Perlen "entfernt" werden.

18.03.00

29

Dies hat den Effekt, daß im wesentlichen nur markierte Ampli-
cons in der Lösung gehalten werden. Die Markierung kann natür-
lich zu Nachweiszwecken verwendet werden, nachdem die markier-
ten Amplicons mit der aminierten Polypropylen-Oligonukleotid-
5 Vorrichtung "ge-screened" werden.

Im Anschluß an eine derartige Amplifikation kann das Probenmaterial der aminierten Polypropylen-Oligonukleotid-Vorrichtung dargeboten werden, die ein Oligonukleotid umfaßt, das eine zu den markierten Amplicons komplementäre Sequenz aufweist. Weil eine bevorzugte Anwendung der aminierten Polypropylen-Oligonukleotid-Vorrichtungen ein Screening von genomischen Proben nach genetischen Mutationen ist, sind die Stringenz-Bedingungen (d.h. die Bedingungen, die es ermöglichen, daß eine Hybridisierung und Dehybridisierung eintritt, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf: Temperatur, Ionenstärke, chemische Bedingungen, Zeit und die Natur der Sequenzen) wichtig. Das heißt, für Mutationen, die nur einen Austausch in den Nukleinsäure-Sequenzen (gegenüber dem Wild-Typ oder der "Normal"-Sequenz) einschließen, ist es sehr wahrscheinlich, daß bei einem Screening auf eine Mutationssequenz sogar die normale Sequenz leicht an das komplementäre Oligonukleotid hybridisiert. Somit ist die Entfernung einer derartigen "unspezifischen" Hybridisierung essentiell. Dies kann beispielsweise erreicht werden, indem eine Reihe von Waschungen mit abnehmenden Salzkonzentrationen angewendet werden, was die Wirkung hat, daß das gesamte unspezifische hybridisierte Material vor Entfernen des im wesentlichen gesamten spezifischen hybridisierten Materials im wesentlichen entfernt wird.

Weil es entscheidend ist sicherzustellen, daß nur komplementäre Sequenzen nachgewiesen werden, wird es von uns gegenwärtig bevorzugt, daß eine "historische" Dehybridisierungs-Analyse durchgeführt wird, so daß wir die Dehybridisierung der Proben-Nukleinsäure-Sequenzen über Zeit und Stringenz-Bedingungen von der aminierten Polypropylen-Oligonukleotid-Vorrichtung wegführen können bzw. ablenken können -- indem die Dehybridisierungs-Muster von nicht-komplementären und komplementären Sequenzen verglichen werden, wenn sie aus der aminierten Polypropylen-Oligonukleotid-Vorrichtung entfernt werden, haben wir sichergestellt, daß die Muster im wesentlichen unterschiedlich sind, so daß eine genaue Feststellung "korrekter"

Hybridisierungen durchgeführt werden kann. Die historische Analyse kann zur Erzeugung eines "Ja/Nein"-Stringenz-Protokolls für spezielle genetische Analysen verwendet werden. Wenn beispielsweise eine spezielle bekannte Mutation ein speziell
5 "historisch" bekanntes Dehybridisierungs-Muster ergibt, dann umfaßt diese Probe, wenn das Muster für eine unbekannte Probe gewonnen wird, die spezielle Mutation.

Im Kern setzen wir das hybridisierte Material einem abnehmenden
10 Salz-Gradienten, unter Verwendung von Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (high performance liquid chromatography = HPLC) Techniken aus, während der Signalverlust (hinweisend auf die Dehybridisierung) über die Zeit kontinuierlich überwacht wird. Wie nachstehend ausführlich dargelegt wird, haben wir experimen-
15 tell bestimmt, daß eindeutige Unterschiede in derartigen Dehybridisierungs-Mustern festgestellt werden können, so daß genaue Bestimmungen, was das Vorhandensein oder Fehlen definierter Sequenzen betrifft, vorgenommen werden können. Für die Analyse genomischer DNA unter Verwendung von Oligonukleo-
20 tiden, die direkt auf beispielsweise aminiertem Polypropylen synthetisiert werden, kann eine derartige Analyse leicht wie vorstehend angezeigt durchgeführt werden.

Die genomische DNA umfaßt typischerweise ein Gen oder Teile
25 davon. Wie hierin verwendet, stimmt der Begriff "Gen" mit der Definition überein, die typischerweise von den Fachleuten verwendet wird. Die genomische Probe kann aus irgendeiner Quelle entstammen, die DNA einschließt, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Pflanzen, Vertebraten bzw. Wirbel-
30 tieren, Wirbellosen, Virus-Quellen etc.

Oligonukleotide mit unterschiedlichen Sequenzen können unter Verwendung verschiedener "Maskierungs"-Vorschriften, wie beispielsweise denjenigen, die bei Maskos, U. und Southern, E.M.
35 "Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions", Nuc. Acids, Res. 20(7): 1675-1678 (1992) beschrieben sind, auf dem Polymer-Medium synthetisiert werden. Im Fall der Oligonukleotide kann das auf die Gesamtoberfläche

eines Polymer-Mediums aufgebrauchte Start-Biomonomer Adenosin sein, wohingegen in nur einem Quadranten des Mediums das Nukleotid Cytidin zugesetzt wird, wobei die anderen drei Quadranten maskiert werden, gefolgt vom Zusatz des Nukleotids

5 Thymidin zu einer Hälfte des Gesamtmediums, wobei die andere Hälfte maskiert wird und über das gesamte Polymer-Medium wird das Nukleotid Guanin zugesetzt. Somit liegt im ersten Quadranten das Tetramer ACTG vor; die eine Hälfte ausschließlich des ersten Quadranten schließt das Trimer ATG ein; und die andere Hälfte

10 schließt das Dimer AG ein. Ein derartiges Material kann zur genomischen Analyse oder für ein Screening auf genetische Mutationen verwendet werden, das verschiedene Allele einschließt. Es existieren beispielsweise zumindest 95 unterschiedliche Nukleinsäure-Sequenzen, die das Gen hervorrufen können, das

15 die Krankheit cystische Fibrose kodiert. Somit kann ein einziges Polymer-Vorrichtung-Medium mit 95 verschiedenen Biopolymeren erzeugt werden, die darauf unterschiedliche Sequenzen aufweisen, wobei jedes der Biopolymere gemäß einer wie vorstehend beschriebenen Maskierungs-Vorschrift erzeugt werden kann.

20 Wechselweise kann man unterschiedliche Biopolymere auf unterschiedlichen Polymer-Medien synthetisieren und diese auf einer einzigen Polymer-Vorrichtung kombinieren. Beispielsweise können im Fall von Membranen verschiedene Abschnitte aus verschiedenen

25 Polymer-Medien, die unterschiedliche Oligonukleotide umfassen, an einer einzigen Vorrichtung befestigt werden. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, daß man leichter einen Teil des Polymer-Mediums einer Qualitätskontrolle unterziehen kann, das das Biomonomer umfaßt, so daß die Qualität einer Vorrichtung, die einen

30 Anteil des Polymer-Mediums umfaßt, sichergestellt werden kann. Im Fall der zystischen Fibrose können beispielsweise 95 getrennte Polymer-Medien (oder eine Subpopulation davon) verwendet werden, die 95 unterschiedliche Oligonukleotide umfaßt, wobei jeder abgeschnitten wird und Teile von jeder

35 Qualitäts-Kontrollverfahren unterworfen wird. Danach können diese 95 Medien auf einem (oder mehreren) einheitlichen Vorrichtung-Medium (Medien) kombiniert werden.

Die offenbaren Polymere können ebenfalls zur parallelen Analyse von Oligonukleotiden oder zum "Sequenzieren durch Hybridisierung" (SBH) verwendet werden. Eine der frühesten und praktischsten Ansätze zu SBH ist von Edwin M. Southern in der 5 PCT-Veröffentlichung Nr. WO 89-10977 "Analyzing Polynucleotide Sequences" offenbart worden. Siehe weiterhin Maskos & Southern, oben (hierin nachstehend "Southern SBH"). Gemäß der Southern SBH-Vorschrift werden viele unterschiedliche Oligonukleotide auf der Oberfläche eines festen Trägers synthetisiert und dann 10 zur Ausführung paralleler Hybridisierungen mit Proben-Nukleinsäure-Sequenzen verwendet. Die Oligonukleotide werden in situ synthetisiert, was die Gleichförmigkeit des Ertrags der Oligonukleotide sicherstellt. Vorteilhafterweise hat die Durchführung der Hybridisierung an alle unterschiedlichen Sequenzen 15 auf derselben Oberfläche in einem einzigen analytischen Durchlauf identische experimentelle Bedingungen für jedes einzelne Oligonukleotid zur Folge. Oberflächenaktiviertes Polymermedium, wie hierin offenbart, ist direkt auf SBH-Vorschriften anwendbar. Oberflächenaktivierte Polymermedien sind weiterhin auf 20 die Zubereitung von Polymeren anwendbar, die lichtentfern timer Schutzgruppen verwenden. Siehe die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 90/15070 "Very large scale immobilized peptide synthesis".

Die offenbaren oberflächenaktivierten Polymere sind besonders 25 für eine in situ Biopolymer-Synthese für "Umkehr-Autoradiogramm-Vorschriften" geeignet. Beispielsweise wird, in einer bestimmten der vorstehend beschriebenen Vorschriften, eine Reihe von Oligonukleotiden, die unterschiedliche definierte Sequenzen aufweisen, direkt auf einem oberflächenaktivierten 30 Polymer synthetisiert (oder "Off-line" synthetisiert und an das Polymer gebunden). Danach wird eine Probe, von der vermutet wird, daß sie ein Polynukleotid mit einer zu einer der Oligonukleotide komplementären Sequenz enthält, darauf aufgebracht. Der Nachweis kann über ein Markierungsschema erzielt 35 werden, das für eine Markierung des Polynukleotids vor der Analyse (Direktmarkierung) oder nach Hybridisierung (indirekte Markierung) sorgt. Weil der Untersuchende den physischen bzw. körperlichen Ort der unterschiedlichen Oligonukleotide auf dem

Polymermedium kennt, liefert das Vorhandensein einer Markierung an einem speziellen Ort eine Information, was sowohl das Vorhandensein als auch die Sequenz irgendeines Materials aus der Probe betrifft, die an die aminierte Polypropylen-Oligonukleotid-Vorrichtung hybridisierte.

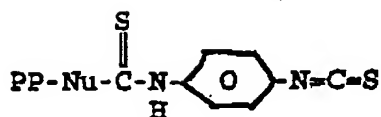
Die offenbarten oberflächenaktivierten, organischen Polymere sind weiterhin auf die Protein-/Peptid-Sequenzierung anwendbar. Wie der Fachmann zu würdigen weiß, ist das Protein-Sequenzieren anders als die Protein-Synthese, auf die Bestimmung der Aminosäure-Sequenz eines speziellen Proteins gerichtet; die Aminosäure-Sequenz eines speziellen Proteins kann dann wiederum beispielsweise zur chemischen Synthese des Proteins oder zur Bestimmung einer allgemeinen oder optimalen Nukleinsäure-Sequenz von Codonen verwendet werden, die die Aminosäuren des Proteins kodieren. Ein wohlbekanntes Verfahren zur Protein-Sequenzierung ist als "Edman-Abbau" bekannt. Siehe Edman, P. und Henschen, A. (1975) in: Protein Sequencing Determination (Needleman, S.B. ed.), S. 232-279, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. Kurz, der Edman-Abbau-Prozeß schließt die Abspaltung von Aminosäure-Resten, einem pro Zeitabschnitt, vom N-Terminus des Peptids und eine Identifizierung dessen als Phenylthiohydantoin-Derivate ein. Dieses Verfahren ist gut beschrieben und wird hier nicht ausführlich dargelegt. Automatisierte Protein- und Peptid-Sequenzier-Geräte sind im Handel erhältlich; beispielhaft ist das Porton LF 3000 Protein Sequenzier-Gerät (Beckman Instruments, Inc.).

Vorteilhafterweise kann ein zu sequenzierendes Protein kovalent an ein oberflächenaktiviertes, chemisch inertes, organisches Polymer, unter Verwendung von 1,4 Phenylen-diisothiocyanat (PDITC), gebunden werden; jedoch kann irgendeine Komponente, die zur Bindung an die Oberfläche des Polymers, und ein Protein, geeignet ist, verwendet werden. Die Kopplungsreaktion kann wie folgt vor sich gehen:

5

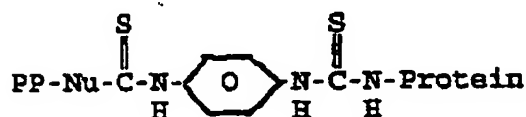


↓



↓ Protein, pH 8-10

10



15 wobei: "PP-Nu" Polypropylen ist, das ein an dessen Oberfläche adsorbiertes Nukleophil umfaßt.

Das kovalent an das Polymer gebundene Protein kann dann effizient unter Verwendung von beispielsweise Edman-Abbau-Vorschriften sequenziert werden.

BEISPIELE

25 Die folgenden Beispiele, die weder als einschränken sollen, noch als solches aufgefaßt werden sollen, sind auf eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung gerichtet -- die Aminierung von Polypropylen, gefolgt von der direkten Synthese von Oligonukleotiden darauf, zur Verwendung bei der

30 Analyse von Proben, die Nukleinsäure-Sequenzen umfassen, für einen Hinweis auf das Vorhandensein sich nicht anpassender Sequenzen, das heißt Mutationen, und die direkte Synthese von Peptiden darauf.

I. MATERIALIEN, METHODEN, GERÄTE UND BESTIMMTE OLIGONUKLEOTIDE

A. Reagentien

5 1.) OLIGO 1000 DNA Synthesegerät

Eine Synthese von Oligonukleotiden wurde unter Verwendung von Beckman Instruments, Inc. BINARY-PAK™ Phosphoramiditen (dA(Bz) - Teil Nr. 337737, dC(Bz) - Teil Nr. 337738, dG(iBu) - 10 Teil Nr. 337739, T- Teil Nr. 337746), DNA-Synthese-Reagenz-Baukasten (Oxidieren - Teil Nr. 337732, DEblock - Teil Nr. 337733, Cap 1 - Teil Nr. 337734, Cap 2 - Teil Nr. 337735, Aktivier-Reagenz (Teil Nr. 338284) und Abspaltungs- und Schutz-entziehungs-Bausatz (Teil-Nr. 337742), durchgeführt.

15

2) Hybridisierungs-Puffer

Alle Chemikalien wiesen zumindest ACS-Güte auf. Der Hybridisierungspuffer bestand aus 6XSSPE/0,01 % Natriumdodecylsulfat. 6XSSPE wurde durch Verdünnung von 20XSSPE (pro Liter: 3 M NaCl, 0,2 M NaH_2PO_4 , 0,02 M EDTA, eingestellt mit 10 N NaOH auf pH 7,4) zum Erreichen von 6X hergestellt, gefolgt von Zusatz von 0,01 % SDS (V/V) dazu.

25

3) D-HAS™ Gradienten-Puffer

D-HAS™ Gradienten-Puffer, der aus 2XSSPE/0,01 % SDS (das 30 heißt durch Verwendung einer 20XSSPE-Stammlösung, Verdünnen auf 2XSSPE und Zugabe von 0,01 % SDS (V/V)) besteht.

4) Radio- bzw. Hochfrequenz-Plasma-Reagenzien

35

Wasserfreier Ammoniak von elektronischer Güte (99,995 % Reinheit) wurde von Liquid Air Corporation (Walnut Creek, CA) unter dem Markennamen ALPHAGAZ™ bezogen. Ultrahochreines

Argon-Gas (99,999 %) wurde ebenfalls von Liquid Air unter demselben Markennamen bezogen.

5 B. Polymer-Vorrichtungs-Medien

Polypropylen-Membranfilterblätter (21,5 cm x 26,6 cm, 0,2 µm Porengröße) wurden von Gelman Sciences Ann Arbor, Michigan unter dem Markennamen METRICEL™ bezogen. Polypropylen-Fäden
10 (0,010 Zoll Durchmesser) wurden von Blue Mountain Industries, Blue Mountain, Alabama (Produkt Nr. MP69) bezogen. Polypropylen-Folie (1,2 mil = 1,2/1000 Zoll = 30,5 µm) wurde von der Catalina Plastics and Coating Corporation (Calabasas, CA) bezogen.

15

C. Im Handel erhältliche Vorschriften

1) Polymerase-Kettenreaktion ("PCR")

20

Eine Amplifikation bestimmter DNA-Makromoleküle wurde unter Verwendung von PCR-Vorschriften durch Anwendung eines Perkin-Elmer Cetus GeneAmp™ DNA Amplifikations-Reagenz-Bausatzes mit AmpliTag™ (Teil Nr. N801-0055) erreicht. Die Anweisungen des
25 Herstellers wurden befolgt.

2) Primer Biotinylierung

30 5'-Biotynilierte Primer für die PCR-Amplifikation wurden unter Verwendung von Biotin-ON™ Phosphoramidit (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, Ca. Teil Nr. 5191) hergestellt. Biotynilierte Primer wurden vor Gebrauch nicht gereinigt. Die Anweisungen des Herstellers wurden befolgt.

35

3) Primer-Markierung

Primer für die PCR-Amplifikation wurden mit γP^{32} (Amersham, United Kingdom) unter Verwendung von USB Cloned T4 Polynucleotide Kinase-Reagenzien 5'-markiert. Den Anweisungen des Herstellers wurde gefolgt.

5

4) Sonden-Markierung

Eine 615 Fluorescein-Sonde wurde am 5'-Ende (Clontech, Kat.Nr. 5235-1) mit Fluorescein-ON Phosphoramidit markiert. Die Anweisungen des Herstellers wurden befolgt.

5) Sulfo-SDTB-Analysen - Amin-Gehalt, quantitativ

15

Der Amin-Gehalt auf Polypropylen-Vorrichtungsm Medien wurde unter anderem unter Verwendung des Sulfo-SDTB-Assays bestimmt (Pierre Chemical, Produkt-Nr. 28610X). Eine Quantifizierung wurde erreicht, indem die Freisetzung eines DMT-Kations aus den Vorrichtungen-Medien unter wäßrigen sauren Bedingungen gemessen wurde. Die erzeugte DMT-Menge wurde aus dem Extinktions-Koeffizienten bei 498 nm von $70.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ oder aus Standard-Kurven geschätzt (AOD 498 nm gegen Sulfo-STDB-Standards). Den Anweisungen des Herstellers wurde gefolgt, mit der Ausnahme, daß 6 N HCl zur Freisetzung des DMT-Kations in Lösung verwendet wurde.

D. Zusätzliche Analytische Vorschriften

30

1) Ninhydrin-Analyse - Amin-Gehalt, qualitativ

Eine qualitative Analyse von aminiertem Polypropylen wurde durch Ninhydrin-Analyse durchgeführt; Ninhydrin, eine heterozyklische Verbindung, komplexiert mit Amino-Gruppen und während des Komplexierungs-Prozesses tritt ein Farbwechsel bzw. -Umschlag von Gelb zu Tiefblau auf. Ungefähr 1 bis 3 Tropfen jeder der folgenden Lösungen wurde aufeinanderfolgend

zu vermeintlich aminierte Polypropylen-Material zugesetzt:

A - Kaliumcyanid/Pyridin (0,01 M KCN/98 ml Pyridin); B - 500 mg Ninhydrin/10 ml Butanol; C - 80 mg Phenol/20 ml Butanol.

Dem folgte ein Erhitzen des Materials bei 110°C für ungefähr 5 2 Min., gefolgt von einer qualitativen Beobachtung der Farbe.

2) DMT-Analyse - Amin-Gehalt, quantitativ

10 Eine quantitative Bestimmung der Aminierung von Polypropylen wurde unter Verwendung einer Modifikation des bei Reddy, M.P. et al. "An efficient procedure for the solid phase tritylation of nucleosides and nucleotides." Tetrahedron Letters 28/1: 23-26 (1987), dargelegten Verfahrens erreicht. Die Amino-Gruppen
15 reagieren mit Dimethoxytrityl (DMT)-chlorid in der Gegenwart von Tetra-n-Butylammoniumperchlorat/2,4, 6-Collidin in Dichlormethan; nach saurer Behandlung wird das DMT-Kation freigesetzt und kann spektrophotometrisch bei 501 nm gemessen werden. Die Ergebnisse können als OD-Einheiten/cm² aminier-
20 tem Polypropylen dargelegt werden.

Die Vorschrift war wie folgt: aminierte Polypropylen wurde in äquimolarer Lösung (0,5 M) von Dimethoxytritylchlorid (Aldrich, St. Louis, MO) and Tetra-n-Butylammoniumperchlorat (Fluka,
25 City, State) in wasserfreiem Dichlormethan, das 2,4,6-Collidin enthielt, suspendiert. Die Reaktion wurde innerhalb zwischen ungefähr 15 bis 30 Minuten abgeschlossen. Das aminierte Polypropylen wurde entfernt und sorgfältig mit Dichlormethan gewaschen. Wasserfreies aminierte Polypropylen wurde danach in
30 10 ml 2%-iger Trichloressigsäure in Dichlormethan (G/V) suspendiert. Das Vorhandensein einer orangen Farbe zeigte das Vorhandensein eines DMT-Kations an, und dies wurde spektrophotometrisch quantifiziert (λ_{\max} - 501 nm, ϵ = 76.000).

35

E. Geräte

1) Hochfrequenz-Gas-Glimm-Plasma-Entladung

Ein Plasma Sciences Gerät Modell 0150E wurde zur Erzeugung einer Hochfrequenz-Gas-Glimm-Entladung in der Gegenwart von Ammoniakgas verwendet.

5

Der Aminierungsprozeß bestand aus den folgenden Schritten:
Ein Grunddruck von 0,1 Torr wurde innerhalb der Kammer bei Start und zwischen jedem Aminierungs-Prozeß, unter einem kontinuierlichem Vakuumpüßbetrieb, eingerichtet. Danach wurde
10 für 4 Min. wasserfreies Ammoniak zur Erzielung eines Kammerdruckes von ungefähr 0,25 Torr eingeführt. Dem folgte die Anwendung von Hochfrequenz-Energie bei 200 Watt für 2 Min. in der Gegenwart des wasserfreien Ammoniakgases. Anschließend an die Abbrechung der Hochfrequenz-Energie wurde die Kammer
15 für zusätzliche 2 Min. bei demselben Druck in Ammoniakgas gehalten. Dem folgte die Einführung von Argongas in die Kammer für 10 Min. bei ungefähr 0,25 Torr. Zuletzt wurde die Kammer unter Auslassen für ungefähr 1 Min. auf atmosphärische Bedingungen zurückgebracht.

20

2) Automatisiertes DNA-Synthesegerät

Die Oligonukleotid-Synthese wurde auf einem automatisierten Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA) OLIGO 1000 DNA-
25 Synthesegerät unter Anwendung einer Chemie-Vorschrift auf Phosphoramidit-Grundlage durchgeführt. Aminiertes Polypropylen wurde für das feste Trägermaterial verwendet. Homo- und Hetero-Oligonukleotide verschiedener Längen wurden gemäß der Anweisungen des Herstellers synthetisiert.

30

3) Kapillar-Gel-Elektrophorese ("CGE")

Eine Kapillar-Gel-Elektrophorese-Analyse der Oligonukleotide wurde auf einem Beckman Instruments, Inc. P/ACE™ 2000
35 Hochleistungs-Kapillar-Elektrophorese-System durchgeführt. Eine 27 cm, 100 µm I.D. Säule (Polymicro Technologies, Inc., Phoenix, AZ) wurde verwendet; eine polymerisierte Polyacrylamid-Gel-Säule wurde innerbetrieblich unter Verwendung von 10 %

T hergestellt. Die Proben wurden über die elektrokinetische Injektions-Methode (7,5 kV; 3,0 sec.) auf die Säulen aufgebracht; eine Trennung wurde bei 300 V/cm für 10 - 30 Min., abhängig von der Oligonukleotid-Länge durchgeführt. Tris-hydroxymethyl-5 amino-methan ("TRIS")-Borat (pH 8,3) wurde als der Laufpuffer verwendet. Der Extinktions-Nachweis war im Bereich von 0,01 bis 1,0 OD_{260nm}/ml, hauptsächlich abhängig von der Länge des Oligonukleotids.

10 4) Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie ("HPLC")

Eine HPLC-Analyse der Oligonukleotide wurde auf einem Beckman Instruments, Inc. System Gold™ HPLC Programmable Solvent Modul 126 durchgeführt, das mit einem Dioden-Array-Nachweis-
 15 gerät Modul 168 und dem Autosampler 507 (20 µl Injektorschleife) ausgerüstet war. Eine C18 Ultrasphere™ HPLC-Säule (Beckman, Teil Nr. 244254; 3 µ Partikel ODS, 4,6 mm x 7,5 cm) wurde verwendet. Flasche A enthielt 0,1 M Ammoniumacetat, pH 6,8; Flasche B enthielt Acetonitril von HPLC-Güte. Das System wurde
 20 in einer Gradienten-Betriebsart wie folgt betrieben (Durchflußgeschwindigkeit = 1 ml/Min.): 0 - 3 Min. - 100 % Flasche A, 0 % Flasche B; 3 - 33 Min. - 100 % Flasche A bis 30 % Flasche A / 0 % Flasche B bis 70 % Flasche B.

25 5) Breadboard Dynamic Hybridization Analysis (D-HAS™) System

Um die Verläufe einer Sonden-Ziel-Disassoziaton über die Zeit hinweg zu analysieren, wurde ein Breadboard Dynamic Hybridization Analysis (D-HAS™)-System aufgebaut. Für das hierin
 30 verwendete D-HAS™-Analysegerät, wurde ein Beckman Instruments, Inc. System Gold™ HPLC Programmable Solvent Module 126 verwendet, das mit einem modifizierten 171 Radioisotop-Nachweisgerät ausgerüstet war; die Modifikation bestand aus dem
 35 Ersetzen der Durchflußzelle mit einer 1/8 Zoll Außendurchmesser/ 1/16 Zoll Innendurchmesser fluorierten Ethylen-Propylen-Copolymer-Röhre.

Diese Röhre ermöglichte die Einfügung von aminierten Polypropylen-Oligonukleotiden, die daran hybridisiert markierte interessierende Sequenzen aufwiesen, und dieses Material wurde wiederum zwischen zwei Polypropylen-Schirmen "ge-sandwiched".

5 Diese Anordnung ermöglichte den Durchfluß von Disassoziations-Puffer durch die modifizierte Durchflußzelle -- somit nahm, als die Dissoziation der markierten Sequenz vom aminierten Polypropylen-Oligonukleotid eintrat, die Anzahl radioaktiver Zähler ab und lieferte somit eine kontinuierliche Spur der

10 Dissoziation der Sonde vom Ziel. Flasche A enthielt D-HAS™-Gradienten-Puffer und Flasche B enthielt 0,01 % SDS. Das D-HAS™-System wurde in einer Gradienten-Betriebsart wie folgt betrieben: 0 - 2 Min. - 100 % Flasche A (1 ml/Min.); 2 - 22 Min. - 0 % - 100 % Flasche B (2 ml/Min.); 22 - 24 Min. - 100 %

15 Flasche B (2 ml/Min.); 24 - 26 Min. - 0 % - 100 % A (2 ml/Min).

6) Geladene gekoppelte Vorrichtung-("CCD") Kamera

Zum Nachweis einer Fluoreszenz-markierten Sonde wurde eine

20 Photometrics Metachrome 2 CCD Array Camera (Tuscon, AZ.) in Verbindung mit einer Photometrics Nu200 Kamera gesteuertem Software Rev. 2.0 verwendet. Die Laserquelle war ein Argonionen-Laser, 457-514 nm (Omnichrome, Chino, CA.).

25

D. Oligonukleotid-Sequenzen

Die in den gesamten Beispielen verwendeten Oligonukleotide wiesen die folgenden Sequenzen auf (zur Vereinfachung der Darstellung nehmen die Beispiele auf die Oligonukleotide durch die aufgelisteten Kennungen Bezug):

30

1. Ziel A (SEQ ID Nr. 1):

35

3'-CCA CAT TTC GGT TGT G-5'

Das 3'-Ende von Ziel A wurde direkt an das aminierte Polypropylen synthetisiert (das heißt, es wurde kein "Linker" verwendet).

5

2. P23 (SEQ ID Nr. 2):

5'-GGT GTA AAG CCA ACA C-3'

10 P23 ist ein Komplement zu Ziel A (Seq. ID Nr. 1)

3. P24 (SEQ ID Nr. 3):15 5'-GGT GTA AGG CCA ACA C-3'

P24 ist eine markierte "Komplement"-Sonde zu Ziel A, mit der Ausnahme der unterstrichenen Base, G (diese Base sollte ein A sein).

20

4. P37 (SEQ ID Nr. 4):

5'-GGT GTA AA..CA ACA C-3'

25

P37 ist eine markierte "Komplement"-Sonde zu Ziel A, mit der Ausnahme einer Zwei-Basen-Deletion (".."), die "GG" sein sollte.

30 5. Ziel A61 (SEQ ID Nr. 5):

3'-T TTA TAG TAG AAA CCA-5'

Das 3'-Ende von Ziel A61 wurde direkt an das aminierte Polypropylen synthetisiert.

6. Ziel A70 (SEQ ID Nr. 6):

3'-T TCT TTT ATA GTA GAA-5'

Das 3'-Ende von Ziel A70 wurde direkt an das aminierte Poly-5 propylen synthetisiert.

7. CFTR Exon 10, Normal (SEQ ID Nr. 7):

10 5'-G TTT TCC TGG ATT ATG CCT GGC ACC ATT
AAA GAA AAT ATC ATC TTT GGT GTT TCC
TAT GAT GAA TAT AGA TAC AGA AGC GTC
ATC AAA GCA TGC CAA C-3'

15

8. CFTR Exon 10, AF508 (SEQ ID Nr. 8):

5'-G TTT TCC TGG ATT ATG CCT GGC ACC ATT
AAA GAA AAT ATC ATT GGT GTT TCC TAT
20 GAT GAA TAT AGA TAC AGA AGC GTC ATC
AAA GCA TGC CAA C-3'

9. CFTR Exon 10 PCR Primer, Sense (SEQ ID Nr. 9):

25

5'-G TTT TCC TGG ATT ATG CCT GGC AC-3'

Dieser Primer war am 5'-Ende biotinyliert.

30

10. CFTR Exon 10 PCR Primer, Antisense (SEQ ID Nr. 10):

5'-G TTG GCA TGC TTT GAT GAC GCT TC-3'

35 Dieser Primer war am 5'-Ende markiert.

11. Spaltbares Ziel 17 monomere Einheiten/Qualitativ

18.03.00

45

(SEQ ID Nr. 11):

3'-TCA GCT ACC GTA AAT GT-5'

5

12. SAM 125 (SEQ ID Nr. 14):

3'-AAG GAC CTA ATA CGG-5'

10 Das 3'-Ende wurde direkt an aminimierte Polypropylenfolie synthetisiert.

13. 615 Fluoreszenz-Sonde (SEQ ID Nr. 15):

15

5'-GTT TTC CTG GAT TAT GCC TGG GAC

Das 5'-Ende der Sonde war mit der Fluorescein-Markierung markiert; der unterstrichene Anteil der Sonde ist zu SAM 125
20 komplementär.

25

30

35

BEISPIEL I

Aminierung von Polymer-Vorrichtungs-Medien

5

Polypropylen-Membran-Filterblätter und -folien wurden dem Hochfrequenz-Aminierungsverfahren, wie vorstehend beschrieben, unterworfen. Im Anschluß an die Plasma-Aminierung wurden ungefähr 1 cm x 1 cm scharfe Schnitte der Blätter und Folien durch
10 die Ninhydrin-Reaktion auf ihren Amingehalt untersucht: nicht-
aminierte ("unberührte") Polypropylen-Kontroll-Blätter und
-Folien zeigten keinen Farbumschlag (d.h. die Farbe blieb
gelb); aminierte Polypropylen-Blätter zeigten eine blaue Farbe,
was auf auf den Polypropylen-Blättern vorhandene Aminogruppen
15 hinweist. Der Rest der Blätter und Folien wurde bei Raumtemperatur (im Dunklen) in Polyethylen-Beuteln aufbewahrt, unter Verwendung eines Elektrodrahtimpulshitze-Versiegelungsgerätes versiegelt. Vor der Oligonukleotid-Synthese wurden Blätter und Folien quantitativ durch Sulfo-SDTB auf ihren Aminogehalt ana-
20 lysiert: unberührtes Polypropylen zeigte ungefähr 0 bis
1 nMol/cm²; eine Polypropylen-Membran, die einer Hochfrequenz-Behandlung unterworfen wurde, wurde als zwischen ungefähr 5
bis 30 nMol/cm² umfassend bestimmt.

25 Polypropylen-Fäden wurden der Hochfrequenz-Aminierungsprozedur wie vorstehend beschrieben unterworfen, mit zwei Ausnahmen:
im wesentlichen lineare Fäden wurden auf den Glasplatten angeordnet und an deren Enden unter Verwendung eines Klebebandes am Ort gehalten, oder die Fäden wurden um einen Zylinderkern
30 eines offenmaschigen, bzw. grobmaschigen, Polypropylen-Materials herumgewunden, gefolgt von einer Befestigung der Kerne (über deren Enden) an den Glasplatten, unter Verwendung eines Klebebandes. Ungefähre Längen von 6 - 18 cm der Fäden wurden zur Bestimmung der Aminierung verwendet. Für eine qualitative Ana-
35 lyse zeigte der unberührte Polypropylen-Faden kein Anzeichen einer blauen Farbe, wenn er den Ninhydrin-Test-Vorschriften unterworfen wurde, wohingegen Polypropylen-Fäden, die der Hochfrequenz-Behandlung unterworfen wurden, die erwünschte blaue

Farbe zeigten. Eine quantitative Untersuchung (über Sulfo-SDTB) zeigte, daß unberührte Polypropylen-Fäden einen Amin-Oberflächengehalt von zwischen ungefähr 0 bis 2 nMol/cm² aufwiesen; Polypropylen-Fäden, die einer Hochfrequenz-Behandlung 5 unterworfen wurden, zeigten einen Amino-Gehalt von zwischen ungefähr 5 bis 30 nMol/cm².

Eine Maskierung der Polypropylen-Blätter (21,5 cm x 26,6 cm) wurde erreicht, indem derartige Blätter auf der Glasplatte 10 innerhalb des Hochfrequenz-Gerätes angeordnet wurden und indem die Blätter mit einem 30 cm x 30 cm Polypropylen-Maschenfiltersieb (Spectra/Mesh Los Angeles, CA, Prod.Nr. 146410, 1000 µm x 1000 µm Nennmaschen-Öffnung) überlagert wurden. Eine Plasma-Aminierung wurde wie vorstehend beschrieben durchgeführt. Ein 15 qualitativer Test auf die Amin-"Musterung" (d.h. das Vorliegen von Amino-Gruppen entsprechend den Nennmaschen-Öffnungen) wurde unter Verwendung eines Sulfo-SDTB-Reagenzes durchgeführt, gefolgt von Spülen in destilliertem Wasser, gefolgt von Halten der Blätter über dem Rauch konzentrierter Salzsäure. Es ergab 20 sich ein "kariertes" Muster, bei dem die nicht-markierten Flächen eine orange Farbe aufwiesen (was auf das Vorhandensein von Amino-Gruppen hinweist), wohingegen die Flächen unterhalb des Maschen-Anteils (maskierte Fläche) weiß waren (was auf das Fehlen von Amino-Gruppen hinweist). Dasselbe Blatt wurde dann in 25 destilliertem Wasser, Methanol und Aceton, gefolgt von Lufttrocknung, gespült. Danach wurde ein 30 dyne-cm blauer Farbstoff Benetzungs-Tension-Test-System-Kit Nr. 5 (Select Industrial Systems, Waukesha, WI) auf das Polypropylen-Blatt aufgebracht; die durch die Masche bedeckte Fläche adsorbierte 30 den blauen Farbstoff, was darauf hinweist, daß diese Fläche hydrophob war (das heißt, Amino-Gruppen fehlen), wohingegen die nicht-maskierten Flächen in ihrer Erscheinung weiß blieben, was darauf hinweist, daß die Fläche hydrophil war (das heißt Amino-Gruppen lagen vor).

BEISPIEL IIBestimmung des Vorliegens von Oligonukleotiden
auf aminiernem Polypropylen

5

Die Bestimmung der Effizienz einer Oligonukleotid-Synthese auf aminiernem Polypropylen gemäß Beispiel I wurde nach HPLC- und CZE-Analyse von Oligonukleotiden vorhergesagt, die auf dem Material synthetisiert wurden, und von diesem abgespalten wurden.

10

Es ist von Bedeutung, daß das Trägermaterial eine im wesentlichen identische Synthese auf dessen Oberfläche ermöglicht -- das heißt, wenn das Trägermaterial eine Variation in der Synthese erlaubt, können Oligonukleotide mit unterschiedlichen Längen darauf synthetisiert werden.

Ein effizientes Mittel zur Bestimmung der Qualität des synthetisierten Materials ist die HPLC- und/oder CZE-Analyse des synthetisierten Materials. Wenn das Trägermaterial eine konsistente und effiziente Synthese ermöglicht, dann sollte das Material, das darauf synthetisiert, entfernt und einer HPLC- und/oder CGE-Analyse unterworfen wurde, einen einzigen Peak erzeugen. Das heißt, es existieren keine oder im wesentlichen geringe "Verunreinigungen", die auf Oligonukleotide hinweisen, die nicht die korrekte Sequenzlänge und Zusammensetzung aufweisen.

Vor Oligonukleotid-Synthese und infolge des Ziels, das synthetisierte Material zu analysieren, wurde eine Linker-Gruppe dem aminiernem Polypropylen zugesetzt. Speziell wurde das aminierte Polypropylen mit dem aktiven Ester des Nukleosid-Succinats kondensiert; dem folgte der Zusatz anderer Nukleoside. Wie klar ist, ist der Succinat-Anteil einer "Spaltung" unter Verwendung von Ammoniak zugänglich.

35

Oligonukleotide mit 17-monomeren Einheiten (SEQ ID Nr. 11) wurden direkt auf aminiernem Polypropylen-Blättern (0,5 cm x 1,5 cm) synthetisiert, die handgerollt wurden und lose in

eine Nadel-Spitzen-Reaktionssäule eines Beckman Instruments OLIGO 1000 DNA-Synthesegerätes gepackt wurden; aminierte Polypropylen-Fäden (ungefähr 20 cm lang) wurden in ähnlicher Weise verwendet. Im Anschluß an die Synthese der Oligonukleotide mit 17-monomeren Einheiten, wurden die Oligonukleotide von den Trägern mit NH_4OH (28%) bei Raumtemperatur eine Stunde lang gespalten, gefolgt von Schutzentziehung mit NH_4OH (28%) für eine Stunde bei 80°C . Die freigesetzten Oligonukleotide wurden dann durch HPLC- und CGE-Techniken unter den vorstehend dargelegten Parametern untersucht. Die Ergebnisse wurden in Fig. 1 (HPLC) und Fig. 2 (CGE) für Oligonukleotide dargelegt, die auf Polypropylen-Blättern synthetisiert wurden (die Ergebnisse für Polypropylen-Fäden erbrachten im wesentlichen identische Ergebnisse; diese Ergebnisse sind hierin nicht zur Verfügung gestellt).

Wie aus den Figuren 1 und 2 klar ersichtlich ist, ist ein einziger, gut definierter Peak beschrieben, was unter anderem darauf hinweist, daß die Synthese-Effizienz auf dem aminierten Polypropylen optimal war (der kleine Peak in Figur 1 wird Benzamid zugeschrieben, das durch die Entfernung von Benzoyl-Schutzgruppen auf dem synthetischen DNA-Strang gebildet wird).

25

BEISPIEL III

Dehybridisierungs-Eigenschaften von Komplementen und Mutationen

Um die Hybridisierungs-Eigenschaften von Polynukleotiden zur Zielerfassung von Sequenzen zu bestimmen, die auf aminiertem Polypropylen synthetisiert wurden, wurden Reihen von Experimenten unter Verwendung von Oligonukleotiden durchgeführt, die Sequenzen aufwiesen, die perfekte Komplemente darstellten (das heißt Analoge zum "Wildtyp") und Sequenzen, die nicht perfekte Komplemente darstellten (das heißt Analoge zu "Mutationen"). Wie erwähnt, ist es in der genetischen Analyse entscheidend, zwischen Wildtyp- und Mutations-Sequenz zu unter-

scheiden; dieses Ziel wird verschlimmert, weil die Befähigung schädlicher Mutationen durch eine einzige Basen-Deletion/Substitution und das Übergewicht einer derartigen mutierten Sequenz zur Hybridisierung an eine Wildtyp-Komplement-Sonde berücksichtigt werden muß. Wegen dieser Faktoren wurde die Hybridisierung von dem Ziel über die Zeit hinweg unter Verwendung des D-HAS™-Systems untersucht.

Das früher erwähnte Ziel A wurde direkt auf aminierte Polypropylen-Membranen unter Verwendung des vorher erwähnten DNA-Synthesegerätes synthetisiert. Danach wurden P23 (perfektes Komplement zu Ziel A), P24 (fehlende Übereinstimmung in einer einzigen Base) und P37 (Deletion von zwei Basen) getrennt zu Ziel A wie folgt eingeführt: aminiertes Polypropylen, das daran kovalent gebunden Ziel A aufwies, wurde in Hybridisierungs-Puffer äquilibriert; danach wurde jede der drei Sonden (0,5 pMol/50 µl Hybridisierungs-Puffer) diesen Membranen, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation bei 25°C, zugesetzt. Der Hybridisierungs-Puffer wurde dann entfernt, und die Membranen einmal mit 200 µl Hybridisierungs-Puffer gespült, danach wurden die Membranen, wie offenbart, dem D-HAS™-System zugesetzt. Eine Untersuchung abnehmender Präsenz markierter Proben wurde durchgeführt, wobei die Ergebnisse kollektiv in Figur 3 dargestellt sind.

Es würde erwartet werden, daß zwischen einem "perfekten" Komplement zu Ziel A und einem "nicht-perfekten" Komplement, unter identischen Bedingungen, das perfekte Komplement länger am Ziel A als das nicht-perfekte Komplement hybridisiert bleiben sollte. Figur 3 beweist die Validität dieser Erwartung. Es wird angemerkt, daß der Unterschied in den Hybridisierungs-Mustern zwischen P23 (dem Komplement) und P24 (mangelnde Übereinstimmung bei einer einzigen Base) ziemlich evident ist; der Unterschied in den Hybridisierungs-Mustern zwischen P23 und P37 (zwei Basen-Deletion) ist noch bemerkenswerter.

Diese Ergebnisse zeigen unter anderem an, daß Wildtyp-Ziel und Mutationsziel(e) direkt auf aminiertem Polypropylen syn-

thetisiert werden können, und daß diese zum genetischen Screening verwendet werden können -- die Fähigkeit, zwischen dem Vorhandensein eines Wildtyp-Komplements und einer Mutation (oder umgekehrt) zu differenzieren, ist evident.

5

BEISPIEL IV

Untersuchung von zystischem Fibrose $\Delta F508$ Exon 10

10

Von CRTR Exon 10, $\Delta F508$ Patienten-Probe (SEQ ID Nr. 8) und CFTR Exon 10, normale Patienten-Probe (SEQ ID Nr. 7) abgeleitete Amplicons wurden durch Professor C. Thomas Caskey (Baylor Medical College, Houston, TX) zur Verfügung gestellt. Diese wurden unter Verwendung der Sense- und Antisense-Primer, die beschrieben wurden, amplifiziert; im Anschluß an die Amplifikation wurden biotinylierte Amplicons entfernt (unter Verwendung von Avidin-beschichteten Perlen), so daß im wesentlichen nur markierte Amplicons für die Untersuchung verwendet wurden.

Sich konzentrierend auf CFTR Exon 10, wird der unterstrichene Anteil der Sequenz (SEQ ID Nr. 7) hierin als die "regionale Mutation" bezeichnet, das heißt in $\Delta F508$ sind die Basen CTT entfernt, so daß ATC TTT als ATT präsentiert wird. Wir haben bestimmt, daß bei der Konstruktion eines Ziels für die regionale Mutation, die auf dem oberflächenaktivierten organischen Polymer synthetisiert werden soll, es bevorzugt wird, daß das Komplement zur regionalen Mutation entlang des Ziels so angeordnet sein sollte, daß es die Anzahl möglicher fehlender Übereinstimmungen maximiert, wenn die Mutation vorliegt. Wenn sich beispielsweise die regionale Mutation entlang des Zieles distal zu dem aminierten Polypropylen befindet, dann sind die entsprechenden Hybridisierungen von, in diesem Beispiel, Exon 10, $\Delta F508$ und Exon 10, Normal, wie folgt: (der unterstrichene Anteil ist das Komplement zur regionalen Mutation):

3' TTC T TTT ATA GTA <u>GAA</u> 5'	Ziel A70
5' AAG A AAA TAT CAT CTT 3'	Exon 10, Normal
5' AAG A AAA TAT CAT [TGG] 3'	Exon 10, ΔF508

5 Somit, auf Exon 10, ΔF508 konzentrierend, werden entlang des Targets A70 mit 16 monomeren Einheiten, wenn Exon 10, ΔF508 daran hybridisiert, 13 komplementäre Basen und 3 fehlende Übereinstimmungen auftreten (angezeigt in Klammern). Durch Verschieben des Komplements zur regionalen Mutation hin zum 10 Polymer, nimmt die Anzahl fehlender Übereinstimmungen zu.

3' TTTATAGTAGAAACCA - 5'	Ziel A61
5' AAATAACATCTTTGGT - 3'	Exon 10, Normal
5' AAATAACAT[TGGTGT]T - 3'	Exon 10, ΔF508

15

Diese Verschiebung verringert die Anzahl komplementärer Basen auf einer Target A61-Exon 10, ΔF508 Hybridisierung auf 10, und erhöht die Anzahl von fehlenden Übereinstimmungen auf 6, das heißt, eine 100 %-ige Zunahme bei den fehlenden Übereinstimmungen. 20 gen.

Die Absicht ist, daß die Anzahl von fehlenden Übereinstimmungen maximiert werden sollte. Dies wird natürlich von der Länge der regionalen Mutation abhängen. Jedoch ist ein bevorzugter Pro- 25 zentsatz von fehlenden Übereinstimmungen zwischen einem Wild-Typ-Komplement-Ziel und einer Proben-Mutation zumindest ungefähr 20 %, bevorzugter ungefähr 40 % und am meisten bevorzugt weniger als ungefähr 50 % (wenn die Anzahl von Basen mit fehlender Übereinstimmung ungefähr 50 % überschreitet, können die 30 Stringency-Bedingungen keine ausreichende Hybridisierung einer Mutation an das Ziel gestatten). Jedoch beziehen sich diese Prozentzahlen auf die Position der fehlenden Übereinstimmung auf dem Ziel und auf die Art der fehlenden Übereinstimmung. Beispielsweise sind distale fehlende Übereinstimmungen bzw. 35 distale Mis-matches weniger bevorzugt als interne Mis-matches, und der G-C Gehalt, der bei der komplementären Hybridisierung involviert ist, ist typischerweise "stärker" als der A-T Gehalt.

Für die Untersuchung der Exon 10, AF508 und Exon 10, Normal Amplicons wurde Ziel A61 verwendet; Ziel A61 wurde direkt auf aminiertem Polypropylen, wie vorstehend beschrieben, synthetisiert. Hybridisierungs- und Dehybridisierungs-Bedingungen waren wie in Beispiel III dargelegt. Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt.

Wie die Ergebnisse von Figur 4 anzeigen, ist der Unterschied in der Dehybridisierung zwischen den CFTR Exon 10, Normal und CFTR Exon 10, AF508 von dem Wild-Typ-Komplement Ziel A61 bemerkenswert -- das Muster für die Dehybridisierung von Exon 10, AF508 ist beinahe zu demjenigen für die Hintergrundstörung identisch. Somit kann eine Analyse von Proben auf das Vorhandensein genetischer Mutationen leicht erreicht werden.

BEISPIEL V

20 Untersuchung von Hühnerei-Lysozym ("HEL")-Peptiden

Die folgenden Peptide wurden direkt auf getrennten aminierten Polypropylen-Membranen synthetisiert. Diese Hühnerei-Lysozym-Peptide wiesen die nachfolgenden Sequenzen auf:

25

HEL 11-25 (SEQ ID Nr. 12):

Ala-Met-Lys-His-Gly-Leu-Asp-
Asn-Tyr-Arg-Gly-Tyr-Ser-Leu

30

HEL 106-116 (SEQ ID Nr. 13):

Asn-Ala-Trp-Val-Ala-
Trp-Arg-Asn-Arg-Cys-

35

Lys

Die Carboxyl-Gruppe von Leu (HEL 11-25) und Lys (HEL 106-116) wurden direkt an das aminierte Polypropylen gebunden, (d.h. Leu

bzw. Lys waren die Starter-Biomonomere). Die Peptid-Synthese wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift durchgeführt, die bei D. Hudson, J. Org. Chem. 53:617 (1988), Milligen Technical Note 4-30, (1987) beschrieben ist. Fmoc-geschützte Aminosäuren 5 wurden von Beckman Instruments, Inc. (Prod.Nr. Fmoc Cys (Trt): 266366; Fmoc Lys (TBoc): 266387; Fmoc Asn: 266351; Fmoc Trp: 266408; Fmoc Ala: 266342; Fmoc Val: 266414; Fmoc Leu: 266384; Fmoc Ser (OTBu): 266402; Fmoc Tyr (OTBu): 266410; Fmoc Gly: 266375; Fmoc Asp (OTBu): 266354; Fmoc His (Trt): 266377; Fmoc 10 Met: 266390; erhalten; Fmoc Arg (Mtr) wurde von Milligen (Prod. Nr. 911014) bezogen. Das Kopplungsreagenz (1,3-Di-isopropylcarbodiimid) wurde von Aldrich (Prod.Nr. D12, 540-7) bezogen. Das Kopplungsmittel (Hydroxybenzotriazol) wurde von Aldrich bezogen (Prod.Nr. 15.726-0). Die Fmoc-Entblockierungs-Gruppe 15 (Piperidin) wurde von Aldrich bezogen (Prod.Nr. 10.409-4). Die Seitenkettengruppen wurden unter Verwendung von 19 ml Trifluoressigsäure (95 %) (Aldrich, Prod.Nr. 29.953-7), 0,5 ml Anisol (Aldrich, Prod.Nr. 12.322-6) und 0,5 ml Ethylmethylsulfid (Aldrich, Prod.Nr. 23.831-7) entfernt, die der Mischung zuge- 20 setzt wurden und bei Raumtemperatur 6 Stunden lang, gefolgt von Waschen mit Ether, stehengelassen wurden.

Um das Vorhandensein dieser speziellen Peptide zu validieren, wurden monoklonale Anti-HEL-11-25 Maus-Antikörper und mono- 25 klonale Anti-HEL-106-116 Maus-Antikörper in einem ELISA-Format verwendet. Die Antikörper wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. Clifford Olson, Beckman Instruments, Inc. bereitgestellt. Diese Antikörper kreuzreagieren nicht mit diesen Peptiden. Drei Bedingungen wurden untersucht: A - aminierte Polypropylen- 30 Membran, die das HEL-11-25 Peptid direkt daran synthetisiert umfaßt; B - aminierte Polypropylen-Membran, die das HEL-106-116 Peptid direkt daran synthetisiert umfaßt; C - Kontrolle (aminierte Polypropylen-Membran). Die ELISA-Bedingungen waren wie folgt: Die Membranen wurden in sechs einzelnen Vertiefungen 35 einer Titer-Platte mit 96 Vertiefungen angeordnet; zwei Vertiefungen enthielten Membran/HEL-11-25; zwei Vertiefungen umfaßten Membran/HEL-106-116; und zwei Vertiefungen umfaßten Membran. Die folgenden Bedingungen wurden für jede Vertiefung

angewendet. Eine Lösung von 1 % BSA wurde jeder Vertiefung zugesetzt, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Dem folgte 3 x 250 µl Waschungen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline = PBS). Das 5 Anti-HEL-11-16 wurde einer Vertiefung aus jedem Satz zugesetzt und das Anti-HEL-106-116 wurde einer Vertiefung von dem verbleibenden Satz zugesetzt. Danach wurden 100 µl Ziegen-Anti-Maus-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war (1 : 5000 Verdünnung) (High Clone, Utah, Teil #EA 1055-X) 10 jeder Vertiefung zugesetzt. Dem folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Min.; danach wurden 3 x 250 µl PBS-Waschungen durchgeführt. Danach wurden 100 µl NBT-BCIP (Nitro-Blau-Tetrazolium - Sigma N 6876, 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat - Sigma, B6149 wie folgt hergestellt: 66 µl einer 15 NBT-Stammlösung (0,5 g NBT in 10 ml Dimethylformamid) und 33 µl BCIP-Stammlösung (0,5 g BCIP in 10 ml 70 % Dimethylformamid), zu 10 ml einer alkalischen Phosphatase-Puffer- (100 mm NaCl; 5 mm MgCl₂; 100 mm Tris-hydroxymethylaminomethan, pH 9,5) Lösung zugesetzt, wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Eine 10-minütige 20 Zeitspanne für eine Farb-(Blau)-Entwicklung wurde bestimmt. Danach wurden die Vertiefungen mit entionisiertem Wasser gewaschen. Das Vorhandensein einer blauen Farbe im Anschluß an die Waschung zeigte das Vorhandensein von Ziegen-Antimaus gebunden an die monoklonalen Antikörper an (die Ergebnisse nicht 25 dargestellt).

Die jeweiligen Antikörper banden spezifisch an ihre jeweiligen Peptide. Beispielsweise wurde keine Farbe Blau in den Vertiefungen beobachtet, die Membran/HEL-11-16 umfaßten und aminier- 30 tem Polypropylen beobachtet, zu dem Anti-HEL-106-116 zugesetzt wurde. Keine Farbe bei dem aminierten Polypropylen zeigt an, daß eine unspezifische Bindung jedes Antikörpers nicht eintrat. Die spezifische Bindung der Antikörper an spezifische Peptide zeigt unter anderem an, daß die HEL-11-25 und HEL-106-116 Pep- 35 tide tatsächlich korrekt auf dem aminierten Polypropylen synthetisiert waren.

BEISPIEL VI

Meßstab-Hybridisierung

5 Ein aminierter Polypropylen-Film bzw. -Folie, der SAM 125
daran kovalent gebunden aufwies, wurde 10 Min. in Hybridisie-
rungs-Puffer eingeweicht. Danach wurden 3 μ l 615 Fluoreszenz-
Sonde in 97 μ l Hybridisierungs-Puffer (100 pMol/100 μ l) da-
zu zugesetzt, gefolgt von einer Inkubation für 90 Min. Dem
10 folgten 4 x 200 μ l Waschungen mit Hybridisierungs-Puffer.
Die Folie wurde dann entfernt und auf einem Glasrahmen ange-
ordnet, gefolgt von einer Untersuchung unter Verwendung der
CCD-Kamera; eine Laser-Drucker-Reproduktion der Ergebnisse
ist in Figur 5 dargestellt.

15

Die Ergebnisse von Fig. 5 zeigen an, daß eine starke Hybridi-
sierung zwischen SAM 125 und 615 Fluoreszenz-Sonde eintrat.
Die Länge der Sonde gegenüber dem Ziel störte die Hybridisie-
rung nicht. Das Meßstab-Format ermöglicht eine schnelle Unter-
20 suchung auf das Vorhandensein oder Fehlen einer genetischen
Mutation von Interesse; die Verwendung von nicht-radioaktiven
Markierungen vermeidet bestimmte Anforderungen, die durch die
Verwendung radioaktiver Markierungen entstehen.

25 Während das Vorhergehende beträchtlich detailliert und bezüg-
lich bevorzugter Ausführungsformen beschrieben wurde, sollen
diese nicht als Einschränkungen der Offenbarung oder Ansprü-
che, die folgen, aufgefaßt werden. Modifikationen und Verände-
rungen, die in den Wirkungskreis des Fachmanns fallen, fallen
30 in den Umfang der nachfolgenden Ansprüche.

SEQUENZ-LISTE

5

(1) ALLGEMEINE INFORMATION

- 10 (i) ANMELDER: Coassin, Peter J.
Matson, Robert S.
Rampal, Jang B.
- 15 (ii) TITEL DER ERFINDUNG: Biopolymersynthese
mittels oberflächen-
aktivierter organischer
Polymere
- 20 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15
- (iv) KORRESPONDENZ-ADRESSEN:
- 25 (A) ADRESSAT: Beckman Instruments, Inc.
(B) STRASSE: 2500 Harbor Boulevard
(C) STADT: Fullerton
(D) STAAT: California
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 92634
- 30 (v) COMPUTERLESBARE FORM:
- (A) MEDIUM-TYP: Diskette, 3,5 Zoll
1,44 Mb
- 35 (B) COMPUTER: IBM
(C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS
(D) SOFTWARE: WordPerfect 5.1

18.03.00

58

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:

- 5 (A) ANMELDENUMMER:
(B) ANMELDE-DATUM:
(C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANWALT/VERTRETER FÜR INFORMATION:

- 10 (A) NAME: Burgoon, Richard P.
(B) REG.NR.: 34.787
(C) REF.NR./DOCKET-NR.: 129D-141

(ix) TELEKOMMUNIKATIONS-INFORMATION:

- 15 (A) TELEFON: (714) 773-6969
(B) TELEFAX: (714) 773-7936

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 1:

20

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- 25 (A) LÄNGE: 16 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein
30 (iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 1

CAA CAT TTC GGT TGT G

35

(3) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 2:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

5 (A) LÄNGE: 16 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 2

15 GGT GTA AAG CCA ACA C

(4) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 3:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

20 (A) LÄNGE: 16 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 3

30

GGT GTA AGG CCA ACA C

(5) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 4:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

35 (A) LÄNGE: 14 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln, einschließlich
Schnitt

(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 4

10 GGT GTA AAC AAC AC

(6) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 5:

15 (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 16 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 5

25

T TTA TAG TAG AAA CCA

(7) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 6:

30 (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 16 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein

18.03.00

61

(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 6

T TCT TTT ATA GTA GAA

5

(8) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 7:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

10 (A) LÄNGE: 98 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 7

20 G TTT TCC TGG ATT ATG CCT GGC ACC ATT
AAA GAA AAT ATC ATC TTT GGT GTT TCC
TAT GAT GAA TAT AGA TAC AGA AGC GTC
ATC AAA GCA TGC CAA

25

(9) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 8:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

30 (A) LÄNGE: 95 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 8

G TTT TCC TGG ATT ATG CCT GGC ACC ATT
 AAA GAA AAT ATC ATT GGT GTT TCC TAT
 5 GAT GAA TAT AGA TAC AGA AGC GTC ATC
 AAA GCA TGC CAA C

(10) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 9:

10 (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Basen
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 15 (D) TOPOLOGIE: linear

 (ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 20 (xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 9

G TTT TCC TGG ATT ATG CCT GGC AC

(11) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 10:

25

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Basen
 (B) TYP: Nukleinsäure
 30 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

 (ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 35 (iv) ANTI-SENSE: ja
 (xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 10

G TTG GCA TGC TTT GAT GAC GCT TC

(12) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 11:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

5

(A) LÄNGE: 17 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 11

15

TCA GCT ACC GTA AAT GT

(13) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 12:

20

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäuren
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) MOLEKÜL-TYP: Peptid
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 12

30

Ala Met Lys Arg His Gly Leu
Asp Asn Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu

(14) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 13:

35

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäuren
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) MOLEKÜL-TYP: Peptid
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 13

10 Asn Ala Trp Val Ala Trp
Arg Asn Arg Cys Lys

(15) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 14:

15 (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 15 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 14

25

AAG GAC CTA ATA CGG

(16) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 15:

30

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Basen
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) MOLEKÜL-TYP: DNA (genomisch)

18.03.00

65

(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZ-BESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 15

5 GTT TTC CTG GAT TAT GCC TGG CAC

10

15

20

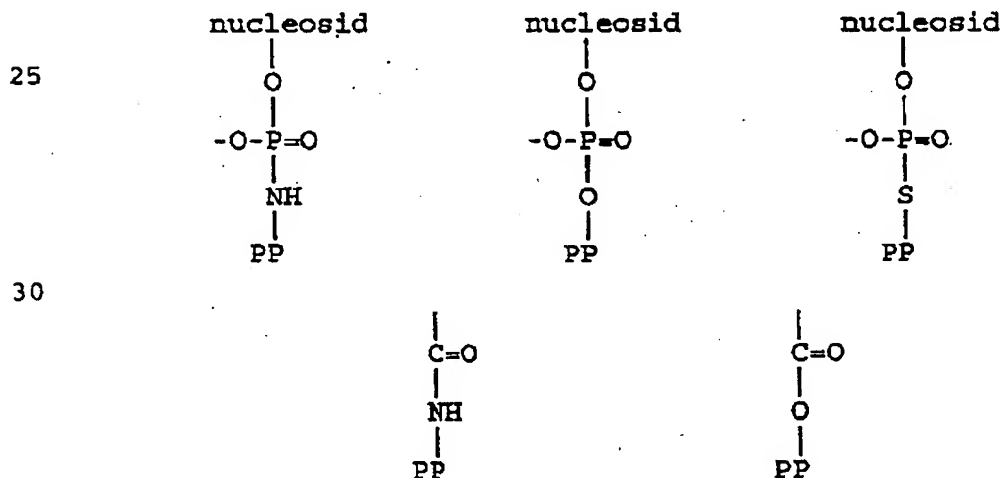
25

5 Patentansprüche:

1. Verfahren zum Synthetisieren von Biopolymeren, insbesondere Oligonucleotiden, Peptiden oder Proteinen, auf einem festen Trägermaterial, wobei das Verfahren ein sequenzielles Verbinden von Biomonomeren, insbesondere von Nucleotiden oder Aminosäuren umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß

(a) Nucleophile auf der Oberfläche eines Polypropylen-Trägermaterials gebildet werden, wobei die Nucleophile aus $-NH_2$, $-SH$ und $-OH$ ausgewählt sind;

(b) das eine erste Nucleotid oder Aminosäure mit den Nucleophilen zur Reaktion gebracht wird, um zuerst eine Biomonomer-Trägermaterial-Bindung ohne Spacer-Arme zu bilden, wobei die Bindungen aus den nachfolgenden Strukturen ausgewählt sind, bei denen PP Polypropylen darstellt:



2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Bildung von Nucleophilen auf der Oberfläche des Polypropylens erreicht wird, indem die Oberfläche einer Plasma-Energie in der Gegen-

wart einer Quelle des Nucleophils ausgesetzt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem das Nucleophil -NH_2 ist und die Quelle des Nucleophils Ammoniakgas ist.

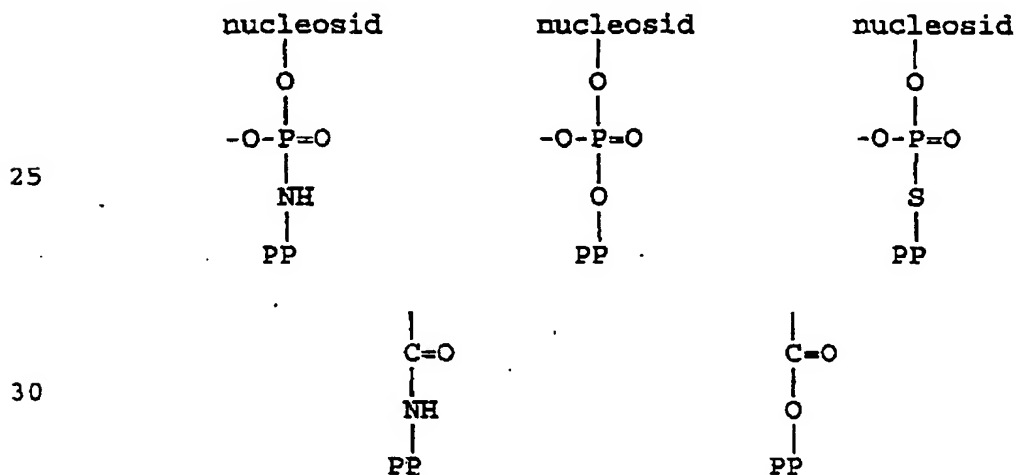
5

4. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem vor Aussetzen der Oberfläche gegenüber Plasma-Energie die Oberfläche mas-kiert wird, um eine ausgewählte, ortsspezifische Exposition der Oberfläche gegenüber der Plasma-Energie zu ermöglichen.

10

5. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Polypropylen in der Form eines Films vorliegt.

6. Vorrichtung, die Biopolymere, insbesondere Oligo-
15 nucleotide, Peptide oder Proteine umfaßt, die kovalent über kovalente Bindungs-Stellen an eine Polypropylen-Oberfläche gebunden sind, wobei jedes der Biopolymere aus einer bekannten Sequenz bekannter Biomonomere, insbesondere von Nucleo-
20 tiden oder Aminosäuren, besteht, und wobei die kovalenten Bin-
dungs-Stellen eine Struktur aufweisen, die aus



ausgewählt ist, wobei PP Polypropylen darstellt.

- 35 7. Vorrichtung nach Anspruch 6, bei der die nucleophile Bindungs-Stelle durch Aussetzen des Polypropylens gegenüber Plasma-Energie in der Gegenwart eines Nucleophil-Reagenzes gebildet wird.

8. Vorrichtung nach Anspruch 6, bei der die Vorrichtung in der Form eines Polypropylen-Films vorliegt.

9. Vorrichtung nach Anspruch 6, bei der die Biopolymere 5 an bekannten Stellen an die Oberfläche gebunden sind.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, bei der die Biopolymere verschieden sind, wobei jedes der verschiedenen Biopolymere an einer unterschiedlichen, bekannten Stelle gebunden ist.

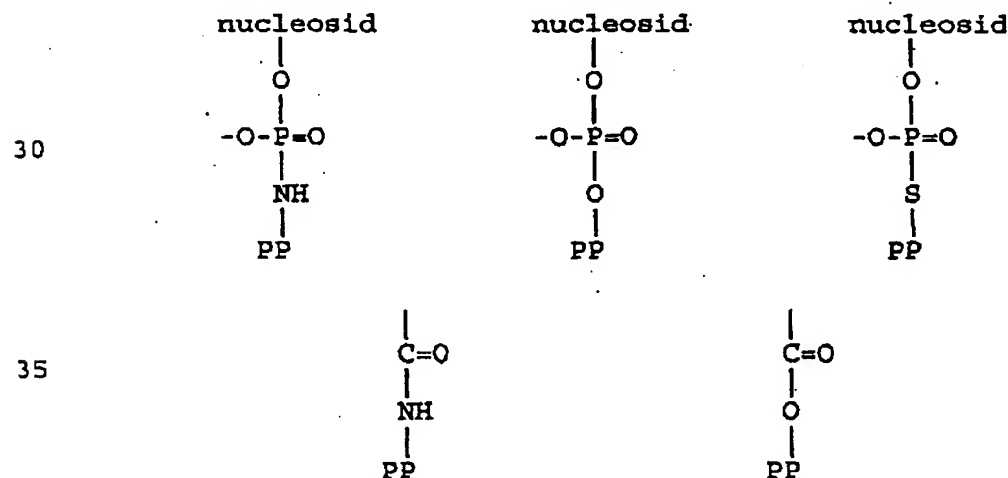
10

11. Verfahren zum Analysieren eines interessierenden Gens, das die folgenden Schritte umfaßt:

(a) Gewinnen einer Probe, die ein interessierendes Gen 15 einschließt;

(b) Einbringen der Probe in eine Vorrichtung, die gebundene Oligonucleotide aufweist;

20 (c) Bestimmen, ob das Gen in einer komplementären Weise an das befestigte Oligonucleotid hybridisiert hat, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Vorrichtung die Oligonucleotide kovalent über nucleophile Bindungs-Stellen ohne Spacer-Arme an eine Polypropylen-Oberfläche gebunden sind, 25 wobei die kovalente Bindung eine Struktur aufweist, die aus



18.03.00

69

ausgewählt ist, wobei PP Polypropylen darstellt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem das Oligo-nucleotid an einer bekannten Stelle an die Oberfläche gebunden 5 ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11, bei der das Oligo-nucleotid an einer bekannten Stelle befestigt ist und bei dem eine Bestimmung, ob das Gen hybridisiert ist, durch Nachweisen 10 des hybridisierten Genes an der bekannten Stelle erreicht wird.

18.03.00

1/5

93 923 172.6
EP 0 721 458

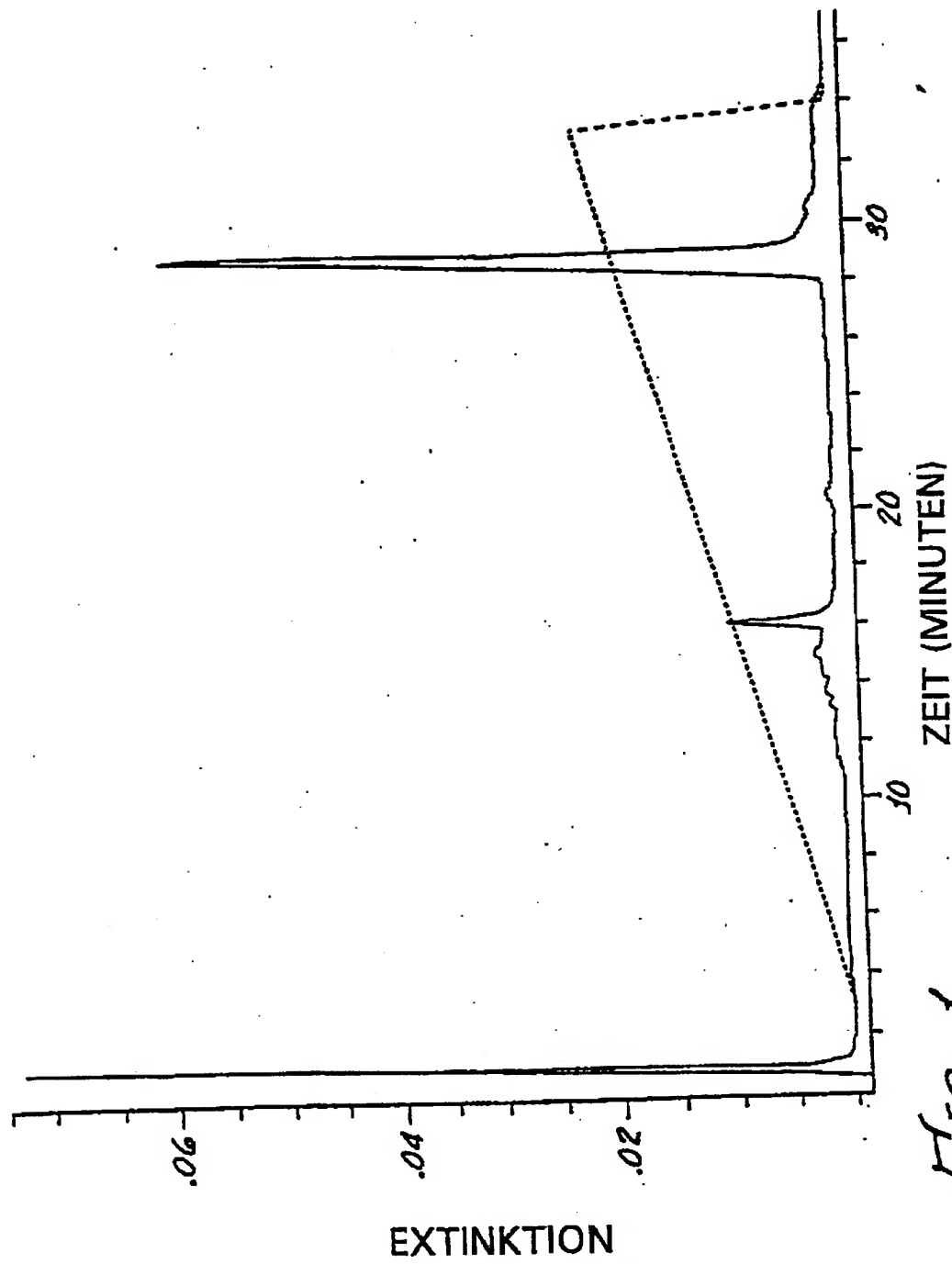


FIG. 1.

18.03.00

2/5

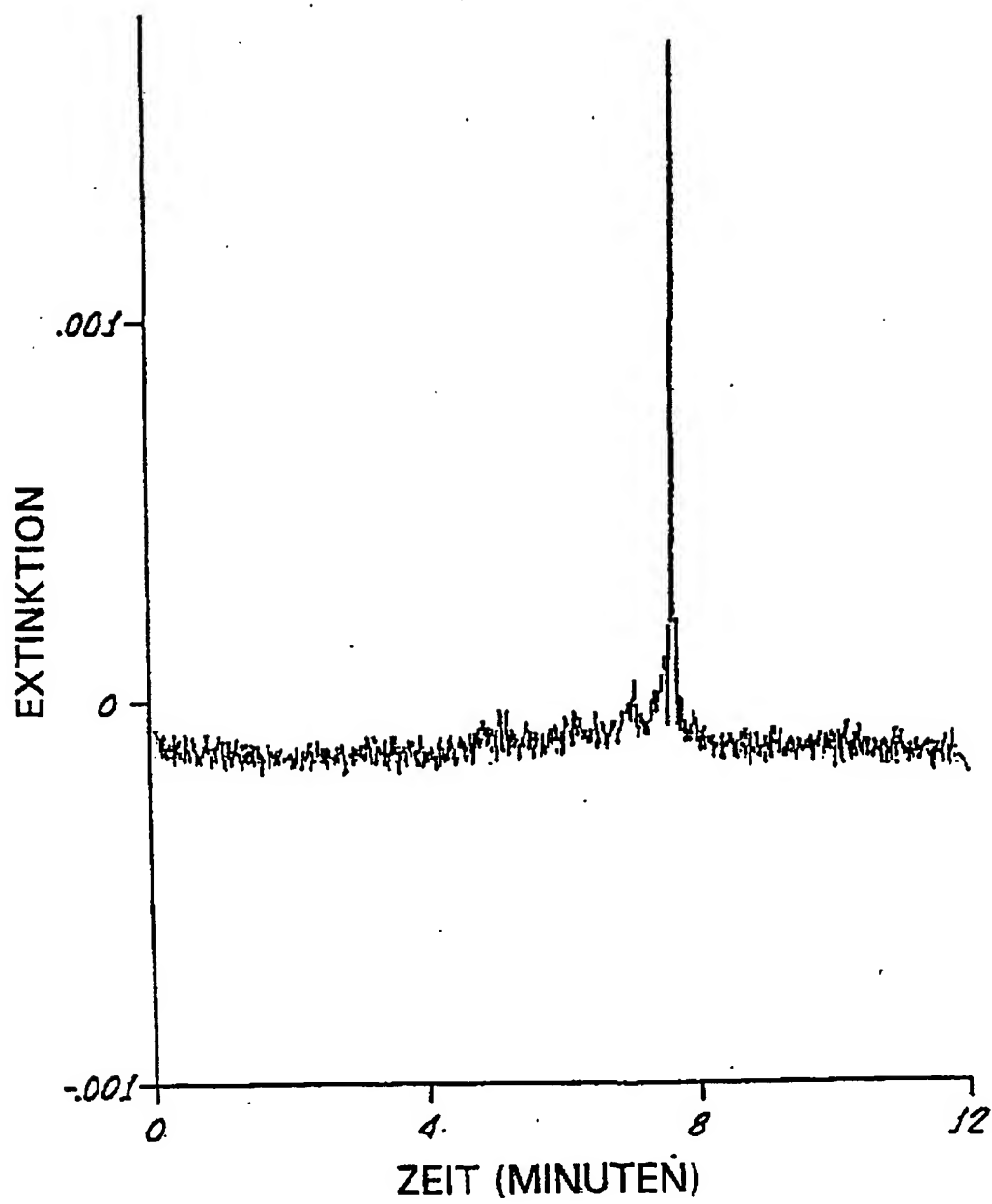


FIG. 2.

18.03.00

3/5

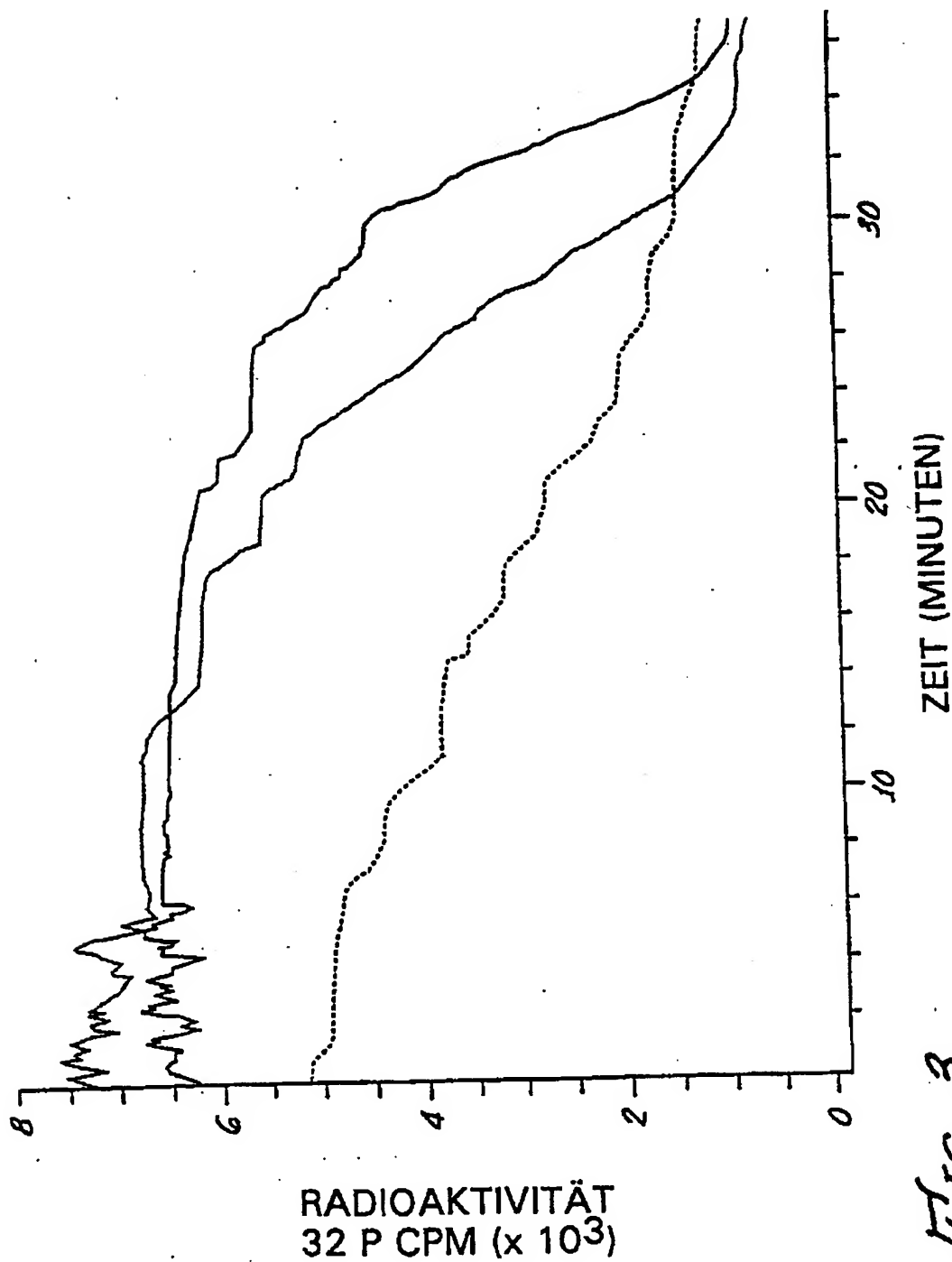


Fig. 3.

18.03.00

4/5

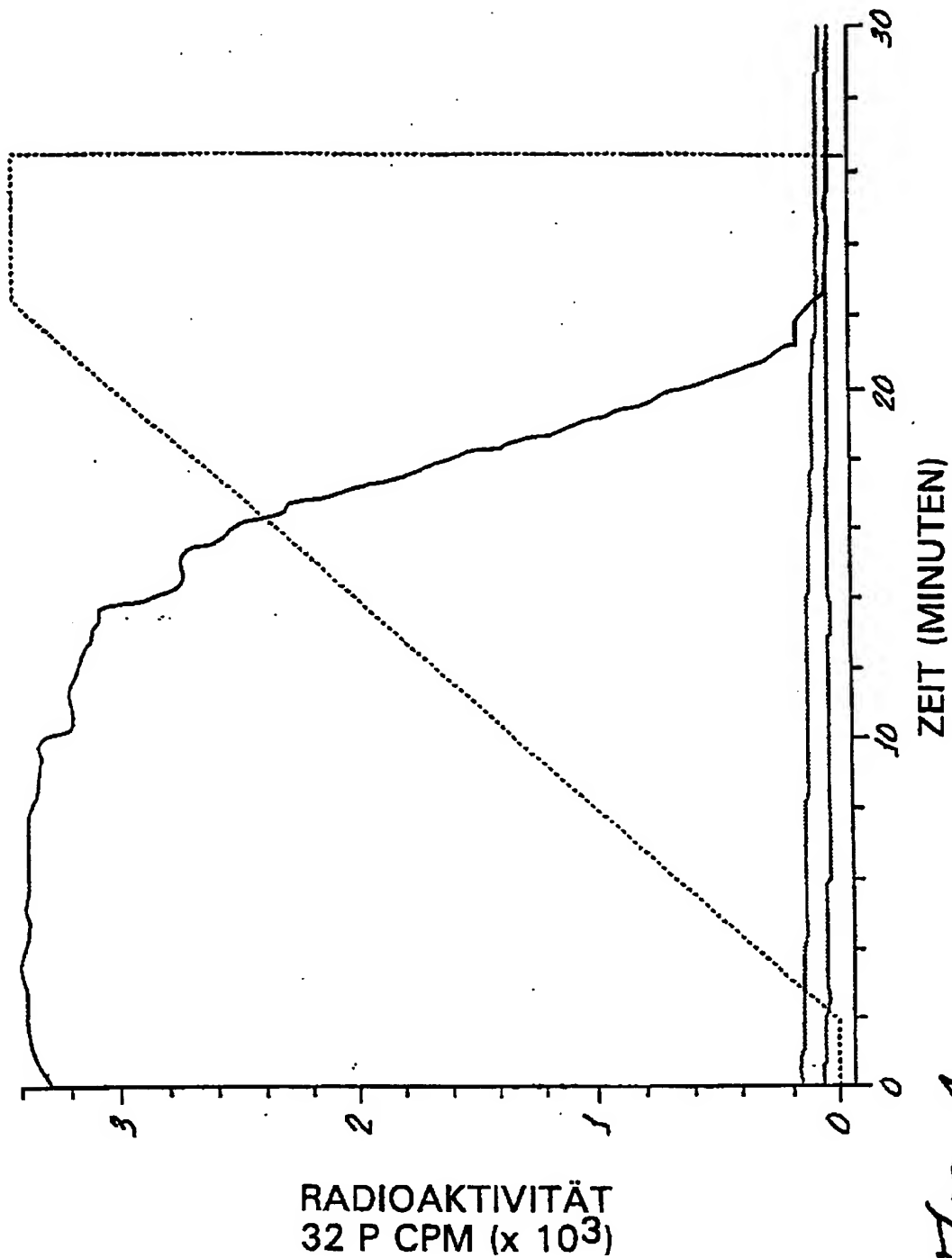


Fig. 4.

18.03.00

5/5

FITC SONDE
(JBR-125/615)

KONTROLLE
(125)

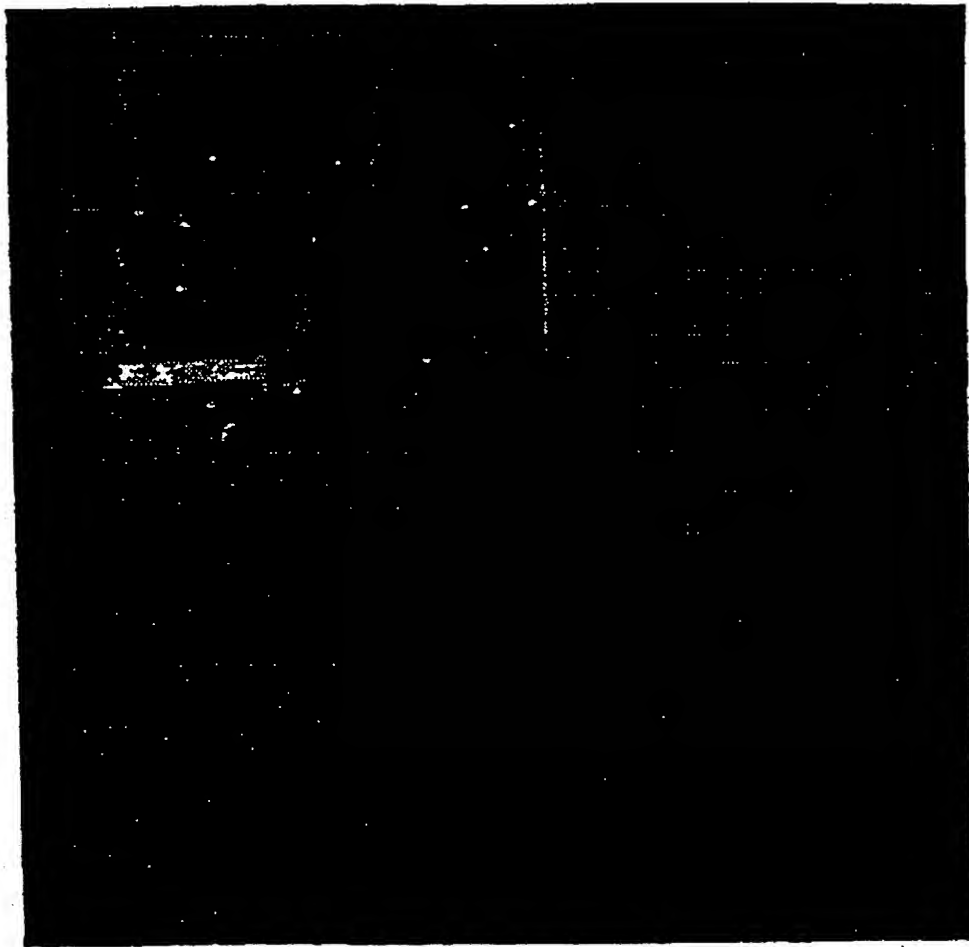


FIG. 5.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)